

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Sciences)

PAR

Sabine von KLEIST

Étude d'un antigène spécifique de tumeurs coliques humaines
d'origine embryonnaire

Soutenue le 2 juin 1970 devant la Commission d'examen.

MM. M. PASCAUD	<i>Président.</i>
J. M. DUBERT	} <i>Examineurs</i>
P. BURTIN	

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1971

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Sciences)

PAR

Sabine von KLEIST

Étude d'un antigène spécifique de tumeurs coliques humaines
d'origine embryonnaire

Soutenue le 2 juin 1970 devant la Commission d'examen.

MM. M. PASCAUD *Président.*
J. M. DUBERT *Examineurs*
P. BURTIN }

LONS - LE - SAUNIER
IMPRIMERIE MAURICE DECLUME

1971



Je remercie Monsieur M. PASCAUD, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, qui a bien voulu présider cette thèse.

Je lui suis très obligée pour l'intérêt qu'il a manifesté à ce travail et les améliorations qu'il lui a apportées.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur J. M. DUBERT, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, qui a trouvé le temps de s'intéresser à cette thèse et en a permis l'aboutissement par ses bienveillants conseils. Sa critique et ses conclusions précises furent un précieux et grand encouragement dans la réalisation de ce travail.

Je m'adresse particulièrement à Monsieur P. BURTIN, Directeur de Recherches au C.N.R.S., pour lui exprimer toute ma gratitude. C'est lui qui m'a acceptée dans son laboratoire, qui m'a enseigné l'immunologie et qui m'a permis de réaliser cette thèse.

Je lui suis sincèrement reconnaissante de m'avoir fait profiter de ses conseils avisés, de sa rigueur scientifique et de sa grande expérience.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de mon attachement respectueux.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur P. GRABAR, Chef de Service à l'Institut Pasteur, qui en tant que Directeur de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer a bien voulu m'y accueillir et m'initier à la recherche immunologique.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur A. LWOFF, Directeur de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, qui m'a permis de continuer mon travail, en témoignage de ma respectueuse admiration.

Je tiens à remercier mes amis du laboratoire pour leur soutien moral et leur concours permanent. Leur aide pour la rédaction de cet ouvrage (« Je vois bien ce que vous voulez dire, mais ce n'est pas français ») me fut indispensable.

J'aimerais que vous, Michèle, Marie-Claude, Thérèse, Françoise, Michèle KOHEN, Gisèle, EKKEHARD, sachiez que je vous suis très reconnaissante.

Mes sincères remerciements vont aussi à Monsieur le Docteur F. LOISILLIER, qui n'a pas seulement fait tous les examens histologiques, mais aussi suivi ce travail avec intérêt.

— A Madame VERNAZOBRES et ses collaborateurs pour l'exécution des photos de ce travail.

— A Monsieur Basile SOBKO pour ses soins portés aux lapins.

— Et à tous les membres de ce service de l'Institut qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre.

INTRODUCTION.

Les cellules normales, unités de base des tissus composant les organes, sont caractérisées par leur obéissance aux règles d'équilibre stationnaire et de contrôle imposées par l'organisme. Les cellules qui échappent à ces contrôles sont des cellules malignes. C'est avant tout par une multiplication anarchique donnant naissance aux formations tumorales que se manifeste la maladie appelée « Cancer ».

L'origine du nom « Cancer », qui veut dire crabe, s'explique par l'aspect rougeâtre et irrégulier des tumeurs qui caractérisent cette maladie connue depuis l'Antiquité.

Le vieux terme « carcinome » datant de HIPPOCRATE (460-377 av. J.C.) témoigne de l'existence de cette maladie dans les temps reculés. C'est CELSUS (70 av.45 ap. J.C.) qui est à l'origine du mot latin cancer. Le cancer existe chez la plupart des êtres pluricellulaires depuis les plantes jusqu'aux mammifères en passant par les invertébrés. Chez l'homme tous les organes sans exception peuvent être affectés, même si la fréquence en est très variable.

GALIEN (131-210 ap. J.C.) a été probablement le premier à établir une classification des tumeurs. Il distingue 3 catégories dans leur ensemble ; suivant qu'elles sont naturelles, dépassent la nature ou lui sont contraires (*tumores praeter naturam*). Il groupe le cancer avec ces dernières, parce que le cancer, suivant ses propres lois, et non celles de l'organisme détruit d'abord les limites histologiques des tissus, ensuite l'organe puis l'organisme, son hôte, et de ce fait lui-même [1].

Depuis l'anatomiste WALDEYER (1867) on distingue les carcinomes des sarcomes en se basant sur le côté histogénétique du malignome (*omnis cellula et cellula eiusdem generis*). Les carcinomes sont tous des tumeurs originaires du tissu épithélial et ses annexes glandulaires, embryologiquement parlant donc des dérivés d'ectoderme, endoderme et mésoderme. A l'heure actuelle des efforts sont faits pour une nouvelle terminologie et on abandonne le terme « carcinome » au profit de désignations plus précises.

Partant de la nouvelle nomenclature publiée en 1965 [2], dans le présent travail nous sommes particulièrement concernés par des épithéliomas et plus spécialement des épithéliomas glandulaires du colon. Nous nous sommes référés à P. MASSON [3] pour leur sous-groupement ainsi que pour le diagnostic histologique des autres tumeurs étudiées.

INTRODUCTION AU SUJET.

Les recherches immunologiques les plus nombreuses sont celles faites sur les néoplasies développées chez l'animal. Ceci s'explique entre autre par la disponibilité du matériel, l'absence de certaines difficultés auxquelles se heurte forcément la recherche sur les cancers humains (nommons à titre d'exemple seulement l'histocompatibilité). Mais une des raisons principales est, que parfois il semble exister un parallélisme étroit entre certains caractères étiologiques et pathologiques des néoplasies animales et humaines.

C'est donc aux expériences faites sur les animaux que nous devons la mise en évidence des antigènes tumorespécifiques [4-10]. Si encourageants que soient ces travaux, il y a encore peu de résultats transposables aux tumeurs humaines malgré l'effort qui a été fait depuis bientôt 60 ans.

Les premières études *immunologiques* sur les tumeurs *humaines* aboutissant à des résultats valables ont été publiées presque simultanément bien qu'indépendamment par HIRSZFELD et al. [11] et WITESKY [12] en 1929. C'est alors que les bases de la recherche immunologique des antigènes spécifiques de tumeurs ont été posées, bien que l'importance de ces premières observations n'ait pas toujours été reconnue : c'est HIRSZFELD [13] qui fut le premier à signaler la parenté entre le tissu cancéreux et embryonnaire chez l'homme en 1932. Ce ne fut qu'à la publication des travaux de ABELEV et de ses collaborateurs que l'intérêt revint sur ce problème. Les études systématiques de ces auteurs et de TATARINOV [14-16] sur les antigènes spécifiques des hépatomes de la souris ont été couronnées par la découverte de l' α_1 -fétuine. C'est une globuline sérique, qui chez l'homme aussi, s'est révélée spécifique du cancer primaire du foie [17-20]. Puis en 1965 GOLD et FREEDMAN ont décrit un antigène tumoral fœtospécifique différent. L'existence possible d'un autre antigène spécifique du cancer a été signalée dans le premier article de GOLD et FREEDMAN, mais n'a plus été décrite par la suite [21-22]. Cet antigène se trouve dans toutes les tumeurs épithéliales dérivées de l'endoderme du tube digestif. Cet antigène n'étant démontrable dans aucun autre tissu normal, pathologique ou néoplasique les auteurs l'ont nommé « carcinoembryonic antigen » (CEA). Cette dénomination, depuis, a été adoptée généralement pour ce genre d'antigène. En 1966 nous avons aussi trouvé un antigène spécifique de tumeurs coliques et présent dans l'intestin fœtal (ACE). Son isolement et sa localisation cellulaire vont faire le sujet de la présente thèse. Nous allons décrire successivement :

— La mise en évidence d'antigènes tumoraux et la détermination de l'origine fœtale de l'antigène choisi (chapitre 1).

— L'isolement et la caractérisation de l'ACE (chapitre 2).

— La localisation de l'ACE dans les cellules des tissus (chapitre 3).

— La présence éventuelle dans le sérum de malades d'anticorps dirigés contre l'ACE ou autres composants des tumeurs coliques (chapitre 4).

PREMIERE PARTIE.

CHAPITRE I.

MISE EN ÉVIDENCE D'ANTIGÈNES TUMORAUX.

Il y a plusieurs façons d'aborder le problème de la mise en évidence d'un antigène spécifique de tumeurs. Une des plus fréquemment employées est l'hyperimmunisation d'animaux avec des extraits tumoraux suivis d'une absorption des antisérums par des extraits normaux. Les risques que l'on prend en employant cette méthode sont d'une part d'absorber des anticorps antitumeur par des antigènes normaux dont la structure est proche (mais pas identique) de celle des antigènes tumoraux responsables de la formation de ces anticorps. D'autre part, on risque de ne pas épuiser avec une quantité et une variété de tissu suffisamment grande pour assurer la spécificité des anticorps éventuellement décelés.

Étant bien conscients de ces problèmes nous avons tout de même choisi cette approche pour notre étude.

I. — Matériel et Méthodes.

A — Matériel.

Les tissus utilisés ont été en grande partie obtenus dans les heures qui suivent les interventions chirurgicales, portant sur des tumeurs. Pour les tissus normaux, des organes provenant d'autopsies précoces ont été retenus, tels l'intestin de jeunes sujets ou divers organes d'adultes normaux, morts à la suite d'accidents opératoires, d'un cancer d'un autre organe, ou d'autres maladies. Tous les tissus ont été soumis à des examens macroscopiques et microscopiques et ce n'est qu'après la confirmation du diagnostic histologique qu'un groupement (pool) de ces tissus a été effectué.

1. LES TUMEURS.

Pour notre étude nous avons utilisé tous les cancers classés histologiquement comme épithéliomas glandulaires typiques avec leurs variantes, en ce qui concerne l'intestin et l'estomac. Pour les néoplasies du bas œsophage proche du cardia, des épithéliomas de type malpighien ont été pris.

Ainsi ont été retenus :

- 565 tumeurs coliques (TC) (rectum, sigmoïde, colon ascendant, transversal et descendant sans distinction).
- 88 tumeurs de l'estomac (TE).

2. LES ORGANES NORMAUX.

a) *Tissu adulte.*

Il était extrêmement difficile, voire impossible, d'obtenir du tissu normal au sens clinique du mot. Nous nous sommes donc contentés de pièces provenant de sujets ayant subi des interventions chirurgicales ou ayant succombé à des affections non cancéreuses. Dans le cas du colon il s'agissait principalement de dolichocolons, d'intestins enlevés pour volvulus, diverticuloses, polyposes ou rétrécissement, pour l'estomac d'ulcères gastriques et duodénaux.

Par la suite il a été nécessaire, et pour certains contrôles préférable, de prendre aussi les organes histologiquement normaux mais provenant de malades cancéreux. Pour le colon, nous avons pris la partie distante de la tumeur (NT) d'au moins 10 cm, car il a été montré qu'en deçà de cette limite on trouve des modifications du spectre de la lacto-deshydrogénase (LDH) vers le type tumoral (augmentation de l'activité de la LDH) [11], ces modifications constituent un indicateur très sensible de changement vers la malignité [23]. Nous nous sommes servi pour cette étude de :

- 47 colons normaux, dont 20 provenant d'autopsies précoces (CN),
- 170 colons histologiquement normaux (NT),
- 25 estomacs normaux (EN).

b) *Tissus fœtaux.*

Des fœtus provenant d'avortements spontanés ou provoqués pour des raisons thérapeutiques nous ont fourni : cœurs, poumons, intestins, estomacs, rates, reins, surrénales.

En plus du matériel déjà énuméré nous avons extrait en milieu acide les tissus suivants :

- a) les tumeurs de divers organes énumérés dans le tableau I,
- b) les organes non tumoraux énumérés dans le tableau II.

B — Méthodes.

1. EXTRACTIONS DES TISSUS.

Au début de notre étude nous avons utilisé les techniques d'extraction introduites dans notre laboratoire par RAPP et al. [24] qui au cours des expériences ont été modifiées.

a) *Extraction en milieu salin neutre.*

Les manipulations des tissus ont été faites dans une chambre froide à +4°C. Les muqueuses intestinales et gastriques ont été soigneusement disséquées de la musculature et libérées le plus possible de toute

TABLEAU I.
Tumeurs de divers organes extraites en milieu acide.

Nombre étudié	Organes	Histologie	Origines
1. Tractus génito-urinaire			
7	Rein	Epithélioma à cellules claires	A
1	Rein	Métastase d'un épithélioma colique	C
4	Testicule	Séminome; dysembryomes	A; C
2	Prostate	Adénomes malins	C
2	Ovaire	Tératome	C
1	Utérus	Epithélioma invasif	C
2. Tube digestif			
2	Colon	Polypes bénins	C
1	Vésicule biliaire	Tumeur primaire	A
2	Foie	Hépatome primaire	A
6	Œsophage	Epithélioma de type malpighien	A
2	Larynx	Epithélioma malpighien spinocellulaire	C
3. Système endocrinien			
1	Pancréas	Métastases hépatiques d'une tumeur du pancréas	A
9	Glandes mammaires	Epithéliomas glandulaires	C
2	Parotide	Epithélioma mixte à stroma remanié	C
3	Thyroïde	Goître macrovésiculaire sans signe de malignité	C
4. Divers			
1	Peau	Mélanome malin	C
3	Méninges	Méningiome	C
1	Culture	HELA	

A : Autopsie.

C : Chirurgie.

TABLEAU II.
Organes non tumoraux extraits en milieu acide.

Nombre étudié	Organes	Diagnostic	Origine
1. Tractus génito-urinaire			
5	Reins	Maladies diverses non cancéreuses (tuberculose, crises cardiaques, pancréatite)	A
6	Reins	Cancers non rénaux (utérus, œsophage, estomac, poumon, lymphosarcome)	A
2. Système reticulo-endothélial			
3	Rate	Rupture traumatique	C
3	Rate	Anémie hémolytique, pancréatite	A; C
3	Rate	Hodgkin; épithélioma glandulaire de l'estomac, cancer de l'œsophage	A
3. Tube digestif			
4	Grêle	Maladies non cancéreuses: appendicite perforée, tuberculose, crise cardiaque	C A
1	Vésicule biliaire	Mort à la suite d'une opération cardiaque	A
1	Œsophage	Carcimone épidermoïde bronchique	A
1	Œsophage	Tumeur bénigne de l'œsophage	A
2	Foie	Tuberculose, mort post opératoire	A
1	Foie	Adénocarcinome du poumon	A
1	Foie	Leucémie	A
4. Système respiratoire			
2	Poumons	Crise cardiaque	A
3	Poumons	Hodgkin, cancer épidermoïde de l'utérus, cancer de l'œsophage	A
5. Divers			
1	Cœur	Crise cardiaque	A

A : Autopsie.
C : Chirurgie.

contamination tissulaire et sanguine par des lavages répétés en solution physiologique tamponnée. Ensuite le tissu a été découpé en petits morceaux et homogénéisé dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 8,2 avec un broyeur « Ultra Turrax TP » à 24 000 rpm (Janke und Kunkel, K. G. Stauffen i. Br., Allemagne). Le broyat a été centrifugé à 10 000 rpm (rotor 30) dans une centrifugeuse réfrigérée MSE High Speed 18 (Measuring and Scientific Equipment, Ltd, London) pendant 20 minutes. Les précipités ont été réhomogénéisés dans le même tampon et centrifugés. Les deux extraits solubles et les culots résultants ont été lyophilisés séparément et stockés à +4°C.

Les tumeurs ont été séparées le mieux possible de tous les tissus non tumoraux. Elles ont été extraites ensuite de la même manière que les muqueuses normales.

Lorsque les tumeurs coliques et gastriques étaient volumineuses, elles ont été extraites individuellement, sinon, nous les avons mélangées et extraites ensemble.

Les tissus fœtaux ont été extraits sans cliver la muqueuse de la musculuse.

b. Extraction en milieu acide.

Nous avons préparé des extraits tissulaires semipurifiés de la manière suivante :

a) Homogénéisation du tissu (traité préalablement comme déjà décrit) dans de l'eau déminéralisée à raison d'une partie de tissu pour deux parties d'eau déminéralisée.

b) Addition de l'acide perchlorique à 10 % v/v sous agitation à la température du laboratoire.

c) Centrifugation à 10.000 rpm (rotor 30) pendant 30 minutes dans une centrifugeuse MSE.

d) Ajustement du pH du surnageant à 7,5 par NaOH 2 M et précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation.

e) Dissolution du précipité (recueilli après centrifugation) dans de l'eau déminéralisée et dialyse pendant 3 jours contre de l'eau déminéralisée.

Le dialysat, après une dernière centrifugation a été lyophilisé. La poudre blanche résultante a constitué notre extrait semipurifié ou « S₁P », abréviation que nous allons désormais utiliser.

2. PRÉPARATION D'ANTISÉRUMS.

Les antisérums que nous avons utilisés ont été obtenus chez des lapins des deux sexes, la plupart appartenant à la race des « Géants des Flandres ».

Pour la première partie de l'étude nous avons immunisé 5 groupes de 3 lapins, chacun avec l'extrait salin lyophilisé d'une tumeur colique. Un 6^e groupe a reçu le mélange des extraits de 5 autres épithéliomas de colon.

Les extraits, après solubilisation dans de l'eau déminéralisée (e.d.) ont été évalués pour leur teneur en protéines par la méthode du

biuret [25]. Chaque lapin a reçu dans les coussinets plantaires des deux pattes arrières 1 ml d'une émulsion contenant l'extrait tumoral ou normal à une concentration de 25-30 mg de protéines avec l'adjuvant complet de FREUND [26]. Après une attente de 15 jours les lapins ont alors reçu des injections de rappel avec les mêmes substances, sauf que l'adjuvant de Freund a été remplacé par une solution à 1 % d'alun d'ammonium v/v. Les rappels ont été faits 3 jours consécutifs par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Les injections intraveineuses ont été abandonnées à cause des chocs mortels survenus trop souvent. Après au moins deux séries d'injections de rappel une prise de sang a été effectuée à la veine extérieure de l'oreille et le sérum a été analysé pour sa teneur en anticorps précipitants. Si le taux se trouvait insuffisant les immunisations étaient poursuivies en ménageant des temps de repos plus ou moins longs. Les périodes d'immunisation allaient de 3 mois jusqu'à un an.

Si par contre le taux d'anticorps était élevé, le lapin était saigné à blanc par canulation des carotides. Les sérums de plusieurs lapins ont été mélangés s'ils se révélaient équivalents. Ils ont été filtrés sur des membranes « Millipore » (Millipore Equipment, Detroit, Michigan) et stockés à -20°C .

Ainsi nous avons préparé des antisérums antitumeurs coliques (aTC), gastriques (aTE), et intestin embryonnaire (aIE).

Contre les extraits S₁P de TC, TE et IE, des antisérums ont été également préparés (aTCS₁P, aTES₁P, aIES₁P). Le schéma d'immunisation a été le même que celui décrit ci-dessous (Tableau III).

TABLEAU III.
Schéma d'immunisation.

Jour	Quantité (protéines)	Adjuvant	Voie
1	20 — 25 mg (5 mg)	Freund	Intracutanée
15 22 16 23 17 24	20 — 25 mg (5 mg)	Alun d'ammonium à 1 %	Intramusculaire ou sous cutanée
29	Saignée d'essai à l'oreille		
30	Saignée à blanc		

Les chiffres entre parenthèses correspondent aux quantités utilisées d'extrait simplifié.

L'épuisement des antisérums.

Tous les sérums étant contaminés régulièrement par des anticorps antiprotéines sériques ont été absorbés par du plasma humain normal

(PHN) à raison de 10-60 mg/ml de sérum. Les antisérums aTC et aTE ont été épuisés en outre par les surnageants lyophilisés d'extrait de colon et d'estomac normaux. Les quantités variaient selon les antisérums entre 10 et 50 mg de protéines par ml d'antisérum.

Un de nos meilleurs aTC a d'abord été absorbé par du PHN et un extrait de CN ; puis alternativement par :

- un mélange de stromas de globules rouges de divers groupes (100 mg/ml).

- un mélange de suspensions de streptocoques et de staphylocoques (10^{10} germes/0,5 ml de sérum).

- un mélange de suspensions de *B. proteus* et *E. coli* (10^{10} germes/ml de sérum).

- des extraits de rate adulte et embryonnaire comme source de leucocytes (100 mg/ml de sérum).

Les contrôles d'épuisement ont été effectués par le ring-test ou par la réaction de double diffusion en milieu gélifié et par l'immunoélectrophorèse.

3. LES TECHNIQUES ANALYTIQUES EMPLOYÉES.

a) *La méthode dite « de l'anneau » (ring-test)* consiste à mettre en contact l'antigène en solution et l'antisérum dans des tubes capillaires sans qu'il y ait mélange des deux. La formation d'un anneau de précipitation à la surface de contact indique une réaction positive.

b) *La réaction de double diffusion* selon OUCHTERLONY [27] a été utilisée. Le milieu a été la gélose (Agar Noble, Difco, Detroit, Michigan) à une concentration finale de 1,5 % dans un tampon véronal 0,05 M à pH 8,2, ou l'agarose (Industrie Biologique Française, Gennevilliers) à une concentration finale de 1 % dans le même tampon. La période de diffusion était généralement de l'ordre de 3 jours à la température du laboratoire. Ensuite les plaques ont été plongées dans un bain d'eau physiologique additionnée de merthiolate (Laboratoires Houde, Paris) à une concentration finale de 1/10.000. Pendant le lavage (2-3 jours) l'apparition des lignes de précipitation a été contrôlée et le cas échéant des photos ont été faites soit en contact direct (il est généralement sans intérêt d'essayer de photographier avant lavage), soit en agrandissant. Nous nous sommes servi d'un agrandisseur PrioX (Paris) et du papier Kodak G3.

Le lavage des plaques a été suivi par séchage sous papier filtre et coloration.

c) *L'immunoélectrophorèse* a été effectuée selon la méthode de GRABAR et WILLIAMS [28] dans la modification de SCHEIDEGGER [29]. Le milieu gélifié et le tampon ont été les mêmes que pour la double diffusion. Le temps de migration était d'une heure et demie à la température du laboratoire, le voltage mesuré aux bornes des plaques de 4-5 V cm.

Après la migration de l'antigène les gouttières préformées, destinées aux antisérums, ont été remplies (0,3 ml) et les plaques ont été placées dans une chambre humide durant 2 à 3 jours. La suite était la même que celle précédemment décrite pour les plaques d'Ouchterlony.

d) Les colorations.

Toutes les plaques ont été colorées suivant les techniques décrites par URIEL [30]. Pour la coloration des protéines nous nous sommes servi de l'amidoschwarz, du rouge Ponceau et du vert lumière. Les lipoprotéines ont été mises en évidence par le noir Soudan.

II. — Résultats.

A — Résultats de la méthode d'Ouchterlony.

Dans tous les extraits de tumeurs coliques testés individuellement ou mélangés, nous n'avons jamais trouvé plus de 3 lignes de précipitation, ceci en utilisant les antisérums anti TC épuisés par le PHN et le CN. Les extraits donnant le plus de lignes de précipitation n'étaient pas ceux ayant servi à la préparation de l'antisérum. Ce n'était donc pas des autoantigènes qui étaient ainsi décelés. Les 3 lignes représentaient des antigènes supplémentaires, absents de la muqueuse colique normale. L'un de ces antigènes était aussi présent dans les extraits de la muqueuse gastrique normale et dans diverses tumeurs malignes (estomac, rein, glande mammaire, ovaire, prostate, testicule). Ce n'était donc pas un antigène spécifique de tumeurs (coliques).

Nous avons obtenu un résultat comparable avec les antisérums aTE (absorbés par la MEN) : 2 antigènes présents et dans les TC et dans les TE ont été révélés. L'un des deux était trouvé aussi dans la muqueuse colique normale (Fig. 1 a). Cependant les extraits de tumeur ne donnaient pas tous ces lignes de précipitation. Il y avait des extraits tumoraux qui étaient pauvres ou mêmes négatifs en antigènes. Le pourcentage des tumeurs étudiées séparément qui montraient 3 lignes de précipitation avec un antiserum donné était plutôt faible ; (par exemple 2 tumeurs sur 18 dans une série). Ceci démontre l'hétérogénéité des tumeurs.

Les antigènes spécifiques de tumeurs coliques ont été comparés aux antigènes de l'intestin embryonnaire. L'aTC épuisé donne deux lignes de précipitation avec l'extrait d'intestin fœtal, l'une d'entre elles étant retrouvée dans les extraits d'estomac et de rate embryonnaires. Les deux lignes se joignent avec une de celles données par l'extrait de tumeur colique (Fig. 2). Il y a donc identité entre certains antigènes embryonnaires et tumoraux.

Un autre antigène apparemment présent, celui-ci seulement dans des organes fœtaux homologues (IE, Ee) et dans les tumeurs gastriques, a été révélé avec nos aTCS₁P (Fig. 3 a-c, 1 b). C'est à cet antigène que nous nous sommes intéressés par la suite.

Toutes les lignes étaient colorables par les colorants classiques pour les protéines. Aucune ne l'était par le noir Soudan.

B — Résultats de l'immunoélectrophorèse.

1. DES EXTRAITS SALINS.

En immunoélectrophorèse nous n'avons obtenu une ligne de précipitation qu'avec quelques extraits TC et parfois TE. La ligne était difficile à obtenir et visible seulement à des concentrations assez

élevées d'extraits (30-50 mg de protéines par ml de solution). La ligne de précipitation que nous avons révélée, surtout avec les aTC épuisés (ep), était de mobilité électrophorétique β par rapport aux protéines sériques (Fig. 4).

Nos extraits ne contenaient que 50-60 % de protéines par rapport au poids sec, la plupart desquelles d'origine sérique. La préparation des solutions plus concentrées posait des problèmes techniques difficiles (par exemple la solubilisation d'une grande quantité d'extrait lyophilisé dans un petit volume). Ceci explique sans doute la discordance entre ces résultats et ceux de la méthode d'Ouchterlony.

Avec les aTC ep. et des extraits de différents organes tumoraux non digestifs nous n'avons pas obtenu de ligne de précipitation.

2. LES EXTRAITS S_1P .

a) *Les tumeurs coliques.*

Avec un immunsérum aTCS₁P et les extraits TCS₁P nous avons révélé presque régulièrement trois lignes de précipitation : une ligne est de mobilité électrophorétique α , les autres lignes ont une mobilité presque identique β par rapport à la migration de protéines sériques. Nous avons observé jusqu'à 2 lignes supplémentaires dont la présence était inconstante, leur mobilité s'étendant de la zone des α_2 jusqu'à la zone des β .

La ligne α , étant donné qu'elle est facilement développée par un aIE, représente un antigène d'origine embryonnaire. L'antigène présent dans l'intestin fœtal l'est aussi dans la muqueuse colique normale, mais en quantité si faible qu'il faut des extraits CNS₁P pour pouvoir le mettre en évidence (Fig. 5).

Fig. 1-3. — Réaction d'Ouchterlony avec les différents extraits tissulaires et antisérums antitumeurs.

Fig. 1a : aTC ep : antisérum a extraits salins de tumeur colique épuisé par le plasma humain normal (PHN) et le colon normal :

TC₁, TC₂, TC₃ : extraits de 3 différentes tumeurs coliques.

CN : Extrait de colon normal.

NT : Extrait de la muqueuse colique non tumorale.

SHN : Sérum humain normal.

Fig. 1b : aTE : antisérum a extrait salin de tumeurs gastriques.

TE : extrait de tumeurs gastriques.

TS : extrait de tumeurs mammaires.

TR : extrait d'une tumeur rénale.

EE : extrait d'estomac embryonnaire.

Fig. 2. — Les abréviations sont les mêmes que dans la figure précédente.

EN : extrait d'estomac normal.

RaE : rates embryonnaires.

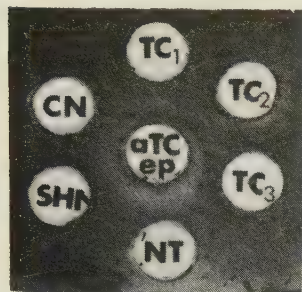
Fig. 3a-c : Les abréviations sont les mêmes que dans les figures précédentes.

aTCS₁P : antisérum a extrait semipurifié de colon tumoral.

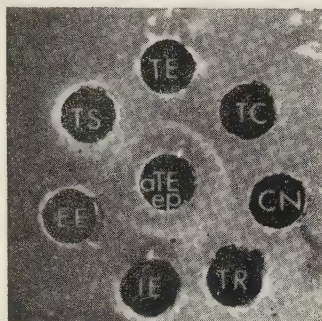
aTES₁P : antisérum a extrait semipurifié d'estomac tumoral.

Les lignes β ont tendance à se superposer et il est parfois difficile de les distinguer. Or, par des essais d'absorption nous avons constaté que les deux antigènes sont présents dans l'intestin foetal ; l'un d'entre eux se trouve aussi dans la muqueuse du colon normal adulte en quantité infime, l'autre en est absent.

FIG.1



a



b

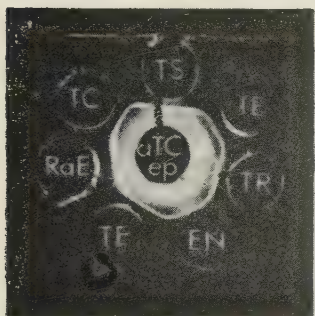
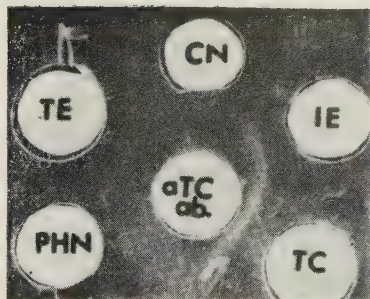
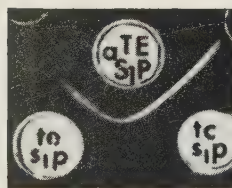


FIG.2

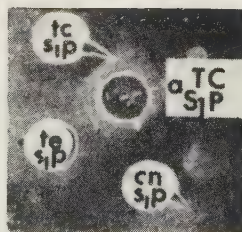
FIG.3



a



b



c

b) *Les autres tissus du tube digestif.*

Les études avec des extraits de TE, d'hépatomes primaires et une tumeur de la vésicule biliaire ont montré que les 3 antigènes principaux y sont présents. D'ailleurs les immunosérums aTE et aTES₁P ont donné des résultats identiques à ceux obtenus avec les antisérums aTCS₁P dans l'étude des extraits salins ou S₁P d'épithéliomas coliques (Fig. 6).

La ligne α seulement a été trouvée dans des extraits de grêle. Les extraits des autres tissus normaux et tumoraux testés en immunoélectrophorèse ont été négatifs. Il faut noter que parmi eux se trouvaient des cancers de l'œsophage et de la parotide.

c) *Les autres organes.*

Différents extraits d'organes ont été étudiés en immunoélectrophorèse. Dans 4 cas nous avons observé la formation d'une ligne de précipitation de mobilité β (Tableau IV).

Discussion.

Ainsi nous avons mis en évidence 3 antigènes présents dans les tumeurs coliques et non dans la muqueuse colique normale. L'un d'entre eux n'est pas seulement présent dans plusieurs tumeurs d'origine extracolique mais aussi dans un tissu normal, la muqueuse gastrique. C'est donc un antigène normal. C'est dire, qu'on ne peut affirmer l'existence d'antigènes spécifiques de tumeur sans avoir absorbé les immunosérums antitumeurs avec des extraits d'autres organes normaux que celui atteint de tumeur. Ce premier résultat est de même ordre que celui obtenu par AVDEEV [31]. Cet auteur étudiait les antigènes apparemment spécifiques de tumeurs gastriques décrits par ZILBER et LUDOGOVSKAYA [32]. Il a pu montrer que l'un de ces antigènes, absent de la muqueuse gastrique normale était présent dans la muqueuse colique normale. D'autres antigènes de tumeurs gastriques étaient aussi présents dans des tumeurs coliques. Grâce à un échange de réactifs, nous avons pu observer leur identité avec deux de nos antigènes coliques. Un résultat tout aussi comparable aux nôtres a été rapporté récemment par KRONMAN [33]. Il a révélé par la méthode d'Ouchterlony un antigène présent dans différentes tumeurs coliques, les anticorps correspondants n'étant pas absorbables par des extraits de colon normal.

FIG. 4. — Immunoélectrophorèse avec des extraits salins de tumeurs coliques individuels (TC₁ - TC₉) et en pool, et un antisérum a extrait de tumeurs coliques (aTC ep).

Le pôle positif se trouve en haut (Fig. 4 et 5).

FIG. 5. — Immunoélectrophorèse d'un extrait semipurifié de tumeurs coliques (TCS₁P) avec un antisérum a extrait S₁P de tumeurs coliques (à gauche) et un antisérum a extrait d'intestin fœtal (à droite).

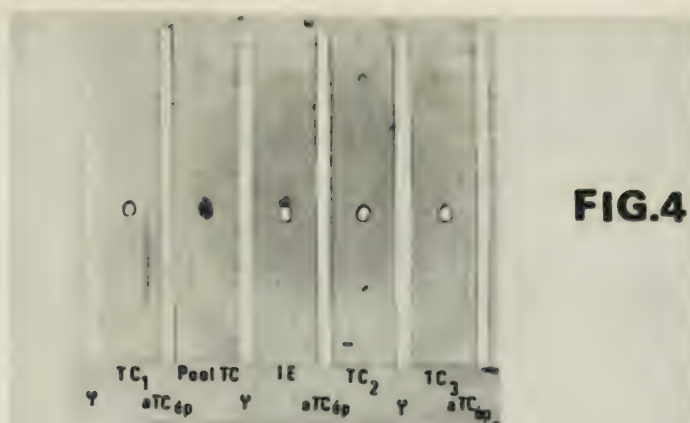


FIG. 5

TEE et al. [34, 35] ont étudié également les antigènes spécifiques des tumeurs coliques humaines et ils en ont trouvé plusieurs. Puisque les auteurs n'ont pas spécifié les antisérums employés pour cette étude on ne peut juger de la valeur de leurs résultats. De même KRONMAN, TEE et al. n'ont utilisé que la technique de double diffusion. Il est donc difficile de savoir si nos antigènes sont identiques aux leurs.

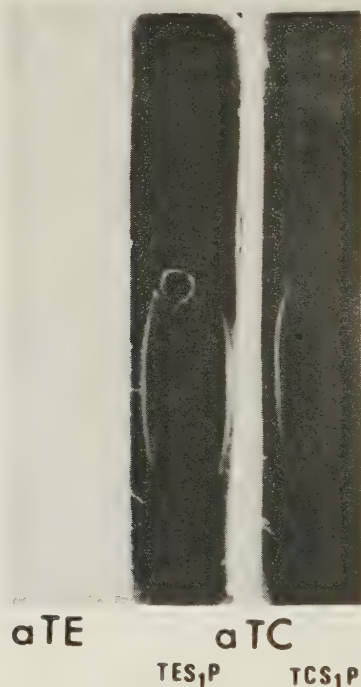


FIG. 6. — Immunoélectrophorèse avec comme antigène TES_1P (à gauche) et TCS_1P (à droite) ; dans les gouttières aTC ep. et aTE ep. Le pôle positif est en haut.

Notre observation d'un antigène sans spécificité d'organes car présent dans une variété de tumeurs rejoint en outre celle faite par BJÖRKLUND et al. [36, 37], MAKARI [38] et KOSYAKOV et KORESTELEVA [39]. Ces investigateurs ont aussi observé qu'il existe des antigènes communs aux diverses tumeurs humaines. Cependant aucun antigène n'a été trouvé qui soit présent dans tous les néoplasmes. WITEBSKY [40], par contre, avec son groupe, n'a pas trouvé d'antigènes tumoraux communs aux différents organes. Cette différence s'explique peut-être par le fait que cet auteur a travaillé avec des extraits alcoolosolubles. D'après nos résultats il est devenu évident, que parmi

tous les antigènes de tumeurs coliques un seul semble avoir une spécificité réelle de tumeur. Il a la mobilité électrophorétique β et il est d'origine fœtale. Il se trouve enrichi dans les extraits semipurifiés de tumeurs coliques où un deuxième antigène de même mobilité électrophorétique est également présent. Ce n'est qu'après cette purification, qui a permis la préparation de nouveaux antisérums, que nous avons pu mettre en évidence immunoélectrophorétiquement ces antigènes. Il a été suggéré [41] que même une purification partielle du matériel injecté peut être favorable à la formation d'anticorps chez les animaux, car en supprimant une compétition inutile parmi plusieurs protéines inintéressantes durant la période d'immunisation, on évite le « crowding out effect » ou la disparition de l'antigène spécifique (qui, si cela se trouve, est le moins antigénique). Nos observations s'accordent bien avec cette hypothèse.

Nos résultats jusqu'ici sont en concordance avec ceux publiés par GOLD et FREEDMAN [21]. Ces auteurs ont décrit au moins deux antigènes spécifiques de tumeurs coliques en utilisant des immunosérums anti-extraits salins tumoraux, épuisés par des extraits salins de muqueuse colique normale. Ils ont montré deux autres antigènes lorsqu'ils ont employé des antisérums aTC obtenus chez des lapins rendus tolérants aux extraits de colon normal dès la naissance. En immunoélectrophorèse ces chercheurs ont toujours vu une seule ligne de précipitation de mobilité $\alpha_2 - \beta_1$.

Dans une deuxième publication [22] les mêmes auteurs signalent l'origine fœtale de leurs antigènes et précisent qu'ils ne se trouvent que dans les tumeurs épithéliales du tube digestif dérivées de l'endoderme. Ils introduisent le terme de « carcinoembryonic antigen » (CEA). Les auteurs ont travaillé avec des extraits perchloriques solubles et n'ont pas trouvé l'antigène dans la partie supérieure du tube digestif (œsophage, parotide).

Le parallélisme de nos résultats avec ceux de GOLD et FREEDMAN nous a amené à faire un échange de réactifs et nous avons pu constater leurs identités.

Nous pensons avoir des antigènes différents de ceux décrits par YACHI et al. [42]. Ces chercheurs ont localisé un de leurs antigènes dans les cancers du colon et de l'estomac, mais ils ne l'ont pas trouvé soluble dans l'acide perchlorique.

CHAPITRE II.

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE L'ANTIGÈNE CARCINOEMBRYONNAIRE (ACE).

Etant assuré de l'existence d'un antigène spécifique des tumeurs coliques d'origine fœtale il fallait essayer un isolement pour pouvoir mieux le caractériser et le suivre à travers d'autres tissus, afin d'établir d'une façon sûre sa spécificité. Nous avons été amenés à introduire alors de nouvelles méthodes pour arriver à ce but et à introduire aussi des contrôles supplémentaires aux différentes étapes de l'isolement.

I. — Matériel et Méthodes.

Notre matériel a été le même que celui énuméré dans le chapitre précédent. Les méthodes d'extraction ont été les mêmes également. Nous nous sommes servi uniquement des extraits S₁P des tumeurs coliques pour la purification.

Méthodes.

1. LES ÉLECTROPHORÈSES PRÉPARATIVES.

Des électrophorèses préparatives en agarose à 1 % dans du tampon véronal 0,05 M, pH 8,2 ont été effectuées afin de séparer les fractions migrant vers l'anode des fractions cathodiques. 100 ml d'agarose ont été coulés sur des plaques de verre 12 × 18 cm pour donner une couche d'environ 3 mm d'épaisseur.

Un réservoir de 6 × 0,2 cm a été coupé au milieu de la plaque et rempli avec le mélange v/v d'une solution faite à partir de 200 mg de poudre par ml de solvant et d'agarose à 2 %. La migration se faisait au froid pendant 2 heures 30 minutes sous une différence de potentiel de 160 volts, et un ampérage de 80 mA. Un échantillon de sérum humain additionné d'une goutte d'amido-schwarz migrant sur la même plaque assurait le contrôle de vitesse de la migration.

Les fractions séparées ont été récupérées de la façon suivante : l'agarose fut coupée en bandes d'un centimètre de large. Chaque bande fut congelée séparément dans un tube à — 20°C, ensuite décongelée et centrifugée à haute vitesse (140 000 g). Ceci permet la sortie hors du gel de l'eau et des protéines qui y sont dissoutes. Les différents surnageants furent testés en immunoélectrophorèse pour leur teneur en

antigène et mélangés selon les résultats de contrôles : nous avons réuni toutes les fractions contenant uniquement des α ou β globulines et éliminé les fractions mixtes.

2. FILTRATION SUR COLONNES.

Pour séparer les deux antigènes de mobilité β nous avons utilisé la filtration sur Sephadex G 200. Nous avons employé des colonnes de verre (100×4 cm) remplies jusqu'à une hauteur de 75 cm de Sephadex G 200 (Pharmacia — Uppsala — Suède) dans du tampon Tris - HCl 0,15 M, pH 8,2. Le produit à séparer a été préalablement dialysé contre le même tampon. Les éluats ont été recueillis sur un collecteur automatique (Technicon, France). Les lectures ont été faites sur un spectrophotomètre (Jobin et Yvon) à 280 m μ . Les tubes ont été groupés en fonction de la courbe obtenue. Après une dialyse de plusieurs jours contre de l'eau distillée, les fractions ont été lyophilisées.

3. ELECTROPHORÈSE SIMPLE EN ACRYLAMIDE-AGAROSE.

La purification de l'antigène a été poursuivie par l'électrophorèse simple en acrylamide agarose suivant les indications d'URIEL [43] en utilisant un tampon Tris-Glycine, 0,013 M, pH 8,7 ; temps de migration 180 mn à 10 V/cm. La coloration des protéines après la migration a été effectuée avec le Coomassie Brilliant Blue (R.E. Gurr Ltd, London, S.W. 14). D'autres colorations ont été faites pour les lipoprotéines, estérases, peroxydases et glycoprotéines [30].

4. ULTRACENTRIFUGATION.

Des contrôles répétés de l'isolement ont été effectués par des centrifugations analytiques dans une ultracentrifugeuse Spinco (Beckman, modèle E). Vitesse de rotation 59,780 rpm, rotor ADN, température 20°C, concentration du produit variant de 2,5 à 10 mg/ml dans une solution de KCl 0,1 M comme solvant.

5. DÉTERMINATION DU POIDS MOLÉCULAIRE.

Une tentative a été entreprise pour connaître le poids moléculaire du produit purifié. Nous nous sommes servi de la méthode suivante d'après ALLISON et HUMPHREY [44, 45]) : On prépare une plaque de gélose tout comme pour une immunoelectrophorèse. Deux gouttières rectangulaires identiques sont creusées à l'angle droit dans la gélose, une gouttière est remplie avec la solution d'antigène, l'autre avec l'antisérum. Après l'apparition nette de la ligne de précipitation la plaque est lavée, séchée et colorée comme précédemment décrit. La mesure au rapporteur de l'angle de diffusion constitué par la ligne de précipitation et la gouttière d'antigène permet de déduire la constante de diffusion (D). Pour déterminer des constantes de référence on utilise une solution d'albumine humaine de poids moléculaire connu et de constante de diffusion connue, que l'on fait diffuser dans les mêmes conditions que la solution à étudier. Ensuite nous avons calculé le poids moléculaire (approximatif) de la manière suivante.

Appelons MX le poids moléculaire (PM) de l'ACE que nous cherchons à déterminer.

Soit : MC = PM de l'albumine = 70.10^3 .
 θC = l'angle de diffusion de l'albumine = 52° .
 θX = l'angle de diffusion de l'ACE = $57^\circ \pm 2^\circ$.

Formules :

1) Constantes de diffusion et angles de diffusion

$$\frac{D_1}{D_2} = \text{tg}^2 \theta$$

DC : Constante de diffusion de l'albumine.

DX : Constante de diffusion de l'ACE.

DI : Constante de diffusion de l'immunsérum.

2) Poids moléculaire et constante de diffusion.

$$M = \frac{K}{D^3} \text{ où } K = \text{une constante}$$

d'où

$$2) \quad \frac{MX}{MC} = \frac{KDC^3}{KDX^3} = \frac{DC^3}{DX^3}$$

$$1) \quad \frac{DC}{DI} = \text{tg}^2 \theta C \quad \frac{DX}{DI} = \text{tg}^2 \theta X$$

$$\frac{DC \ DI}{DI \ DX} = \frac{\text{tg}^2 \theta C}{\text{tg}^2 \theta X}$$

$$2) + 1) \quad MX = MC \left[\frac{\text{tg} \theta C}{\text{tg} \theta X} \right]^6$$

6. PRÉPARATION DES ANTISÉRUMS.

Nous avons préparé des antisérums aACE en injectant à des lapins :

1) La fraction purifiée obtenue après filtration sur Sephadex.

2) La ligne de précipitation de l'ACE découpée dans la gélose après immunoélectrophorèse. Ce petit morceau de gélose et de précipité spécifique a été émulsionné dans la solution de l'adjuvant de Freund.

II. — Résultats.

1. FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G 200.

Lorsque nous avons mis notre extrait S_1P de tumeur colique sur la colonne de Sephadex nous avons obtenu très régulièrement une courbe comprenant un pic suivi d'un plateau duquel se détache parfois un deuxième pic (Fig. 1 a).

Par contre, si le produit était constitué d'éluats de la région électrophorétique β seulement, une courbe à un pic a été obtenue comme le montre la Fig. 1 b. Le plateau n'y est pas, mais parfois le deuxième pic.

Dans la fraction composant le premier pic nous avons trouvé une seule ligne de précipitation en immunoélectrophorèse avec les aTCS₁P. Les anticorps correspondants ne pouvaient pas être absorbés par des extraits CN ou CNS₁P mais par des extraits IE ou IES₁P. Il y a cependant très peu d'antigène CE dans ces derniers extraits ce qui se traduit par la quantité très élevée de IE et IES₁P nécessaire pour réaliser une absorption complète des anticorps aACE (Fig. 2).

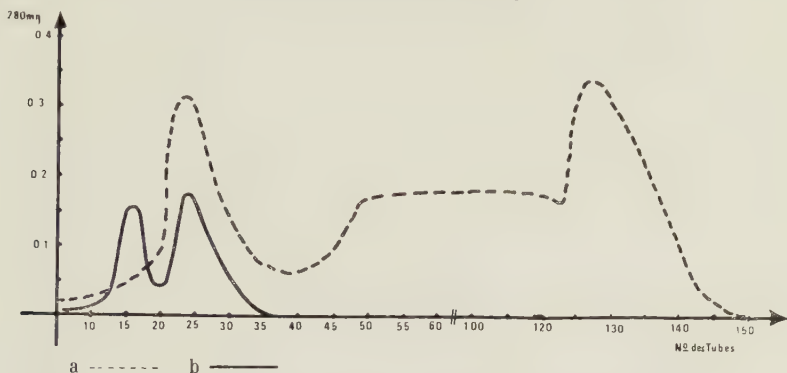


FIG. 1. — Filtration sur colonne de Sephadex G 200 d'extrait S₁P de tumeur colique (a) et d'éluat de la région électrophorétique β (b).

2. LA MIGRATION EN ACRYLAMIDE AGAROSE.

En analysant le premier pic en acrylamide agarose, une bande principale a été observée en avant du réservoir. Il y avait aussi une très faible tache contaminante d'une mobilité supérieure.

3. L'ULTRACENTRIFUGATION.

La centrifugation analytique a été rendue initialement très difficile par de fortes contaminations polysaccharidiques venant du Sephadex. Des lavages prolongés par des tampons chauffés ont été nécessaires pour obtenir les résultats suivants :

Lors de chaque centrifugation deux pics furent enregistrés (Fig. 3). Leurs constantes de sédimentation étaient de :

- 2,4 S et 2 S dans la première expérience,
- 4,1 S et 7,2 S dans la deuxième expérience.

Ces valeurs ont amené à avancer l'hypothèse que notre substance forme facilement des bi- ou polymères. L'hypothèse est soutenue par la formule employée par REVET [46] pour leur détermination :

$$\frac{S_1}{S_2} = \left(\frac{M_1}{M_2} \right)^{\frac{2}{3}}$$

M_1 et M_2 représentent deux masses moléculaires et S_1 et S_2 les coefficients des constantes de sédimentation sous les mêmes conditions expérimentales.

Nota. — La formule n'est rigoureusement vraie que pour des particules parfaitement sphériques.

Si $M_2 = 2 M_1$, alors $S_2 = 1,58 S_1$. Dans notre cas $S_2 = 1,54 S_1$. Les valeurs étant très proches l'une de l'autre il est très probable que le deuxième pic corresponde à un polymère du premier.



FIG. 2. — Immunoélectrophorèse avec comme antigène la fraction composant le premier pic ; dans les gouttières aTCS₁P ep. (à gauche) et aTCS₁P ep. en plus par l'IE (à droite). Le pôle positif est en haut.

4. CARACTÉRISATION.

La ligne de précipitation était colorable par tous les colorants usuels pour les protéines et par le réactif de Schiff ; mais elle ne l'était pas avec le Soudan Noir. Une activité enzymatique n'était pas décelable (estérase, peroxydase).

L'antigène a été trouvé résistant à la chaleur au point de supporter un chauffage de 40 minutes à 99°C. Les enzymes (trypsines, chymotrypsine, RNase, DNase) n'ont pas détruit l'antigène.

Le poids moléculaire a été estimé au-dessus de 14 200 et en dessous du PM de l'albumine (66 000).

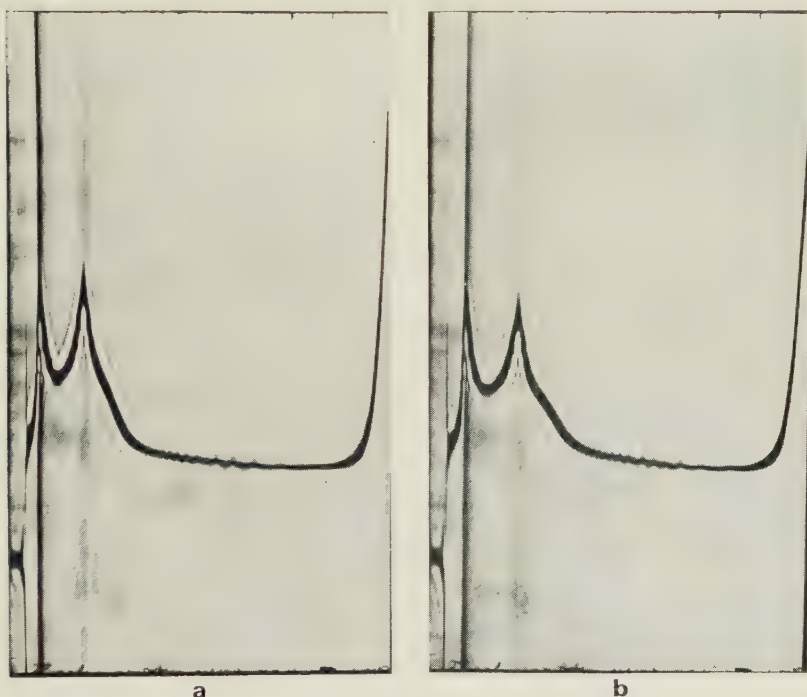


FIG. 3. — Diagramme d'ultracentrifugation de la fraction composant le Pic I après 62 minutes 15 secondes (a) et 78 minutes 51 secondes (b).

5. ÉTUDE DES ORGANES.

L'antigène purifié n'a pas été trouvé dans la muqueuse normale du colon, de l'estomac, du grêle et de l'œsophage. Il était également absent des tumeurs de l'œsophage et de la parotide. La recherche de l'antigène CE dans d'autres tissus cancéreux et non cancéreux a été positive dans 4 cas seulement (tableau IV).

Dans deux cas il s'agissait de rates provenant de patients ayant un épithélioma gastrique envahissant. Un cas était une très volumineuse tumeur rénale qui s'est révélée être une métastase d'un épithélioma colique. Le dernier cas était également un rein provenant d'un malade ayant succombé à un adénocarcinome gastrique.

Discussion.

L'antigène que nous avons isolé des tumeurs coliques et trouvé présent normalement dans l'organe homologue fœtal est donc l'antigène carcinoembryonnaire. Il est similaire, voire identique à celui isolé par KRUEY et al. [47]. Nous pensons que pour une raison encore inconnue la substance tend à se polymériser pendant le processus de purification. Les valeurs de sédimentation quelques peu variables rapportées par les auteurs canadiens (5,1 S [47] ; 6,9 — 8,02 S [48]) viennent à la rencontre de notre hypothèse.

TABLEAU IV.

*Liste d'organes non coliques
dans lesquels l'antigène carcinoembryonnaire a été décelé.*

Organe	Diagnostic	Prélèvement
Rein	Métastase volumineuse d'un épithélioma colique	Autopsie
Rein	Adénocarcinome gastrique avec métastases multiples <i>non rénales</i>	Autopsie
Rate	Epithélioma glandulaire envahissant de l'estomac	Autopsie
Rate	Epithélioma de l'estomac n'envahissant pas la rate	Chirurgie

Nous n'avons pas trouvé l'antigène dans des tumeurs autres que celles du tube digestif (à l'exception de l'œsophage et de la parotide) ou dans des métastases de ces tumeurs, ce qui est conforme aux observations de GOLD et collaborateurs.

Toutefois nous avons trouvé l'antigène spécifique dans deux rates prélevées sur des sujets atteints de cancer digestif et dont l'une au moins n'avait pas de métastases, même microscopiques.

ZILBER [49], qui a étudié les antigènes des tumeurs gastriques, a retrouvé un de ces antigènes dans la rate. L'auteur n'a pas spécifié si l'organe venait d'un malade cancéreux. A la lumière de nos résultats il nous semble qu'il faut distinguer les organes normaux venant de personnes « saines » des organes normaux venant de sujets cancéreux. Nous n'avons pas trouvé notre antigène par exemple dans les rates enlevées pour rupture traumatique.

Deux questions se posent :

— Où l'antigène CE, lorsqu'il existe, se localise-t-il dans la cellule ?

— L'antigène CE est-il autoantigénique ?

Dans les deux derniers chapitres nous allons essayer de donner les réponses à ces questions.

CHAPITRE III.

LOCALISATION DE L'ACE DANS LES CELLULES.

Une preuve supplémentaire de la spécificité et de l'origine de l'ACE est donnée par la mise en évidence de cet antigène dans les cellules tumorales et embryonnaires intestinales par une technique différente de celles déjà employées. L'immunofluorescence nous a donné les résultats suivants [50].

I. — Matériel et Méthodes.

A — Matériel.

Huit épithéliomas glandulaires prélevés chirurgicalement non fixés ont servi à l'essai. De chaque pièce opératoire une partie de la tumeur et une partie de la muqueuse distante de la tumeur ont été prélevées. La deuxième servait de contrôle.

Des échantillons d'intestins de 3 fœtus âgés de 3, 4 et 5 mois environ et d'un sigmoïde enlevé pour un volvulus ont été également pris.

B — Méthodes.

Des coupes sérieées à congélation de tous les tissus ont été effectuées (Linde Kryostat, Heidelberg, $t = -20^{\circ}\text{C}$, microtome réglé à $6\ \mu$). Les coupes, placées sur des lames microscopiques, ont été fixées à l'alcool absolu pendant 10 minutes et séchées. Chaque 5^e coupe a été colorée à l'hémalum-éosine afin de contrôler la qualité et la localisation des préparations.

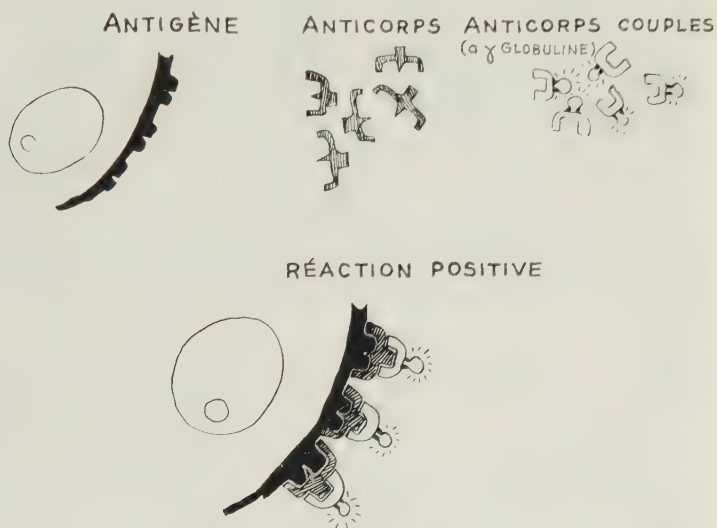
Pour les marquages nous avons employé la méthode indirecte (dite « sandwich ») de Coons et al. (Schéma). Comme premier réactif nous nous sommes servi de l'un des antisérums suivants qui ont tous été préparés chez le lapin : 2 immunsérums aACE, un antisérum aCN, un immunsérum aIE et à titre de contrôle un immunsérum aIgG humain ($a\gamma$) et un sérum de lapin normal.

Nous avons aussi utilisé un antisérum aACE épuisé par 1 mg/ml d'antigène purifié. L'épuisement a été vérifié en immunodiffusion et par ring-test.

Comme 2^e réactif nous avons employé un antisérum de mouton anti-globuline de lapin couplé à la fluorescéine (Inst. Pasteur, Paris).

La technique de marquage était la suivante : sur les coupes fixées a été appliquée une goutte d'un des antisérums énumérés (premier

réactif). Puis les coupes ont été incubées pour 20 minutes dans une chambre humide à la température ambiante. Ensuite elles étaient rincées 2-3 fois à l'eau physiologique tamponnée afin d'enlever les anticorps non fixés. Puis les coupes furent incubées avec l'antisérum fluorescent dilué au 1/10 pendant 20 minutes à la même température ambiante (2° réactif). Enfin elles furent rincées à l'eau physiologique 2-3 fois et 1 fois à l'eau déminéralisée pour enlever les sels et toute autre contamination. Les lames ainsi marquées ont été étudiées à l'aide d'un microscope à fluorescence Orthoplan (Leitz, Wetzlar, Allemagne) équipé d'une lampe HBO 200. Le microscope était équipé d'un condenseur à fond noir, des filtres : excitation UG γ ou BG 12, arrêt devant oculaire, un filtre jaune K, d'une caméra automatique Orthomat (Leitz, Wetzlar) avec laquelle des diapositives en couleur ont été prises sur film Anscochrome D 200.



SCHEMA DE MARQUAGE INDIRECT ('sandwich') SELON COONS

II. — Résultats.

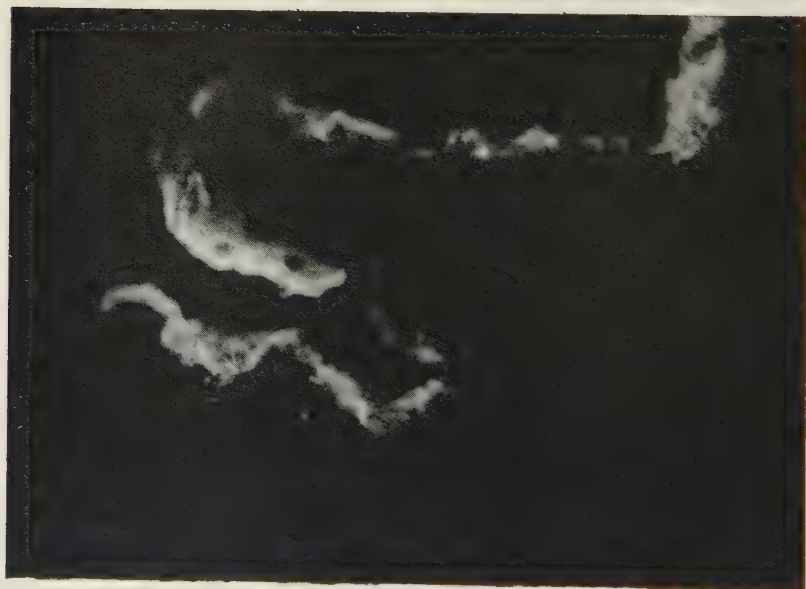
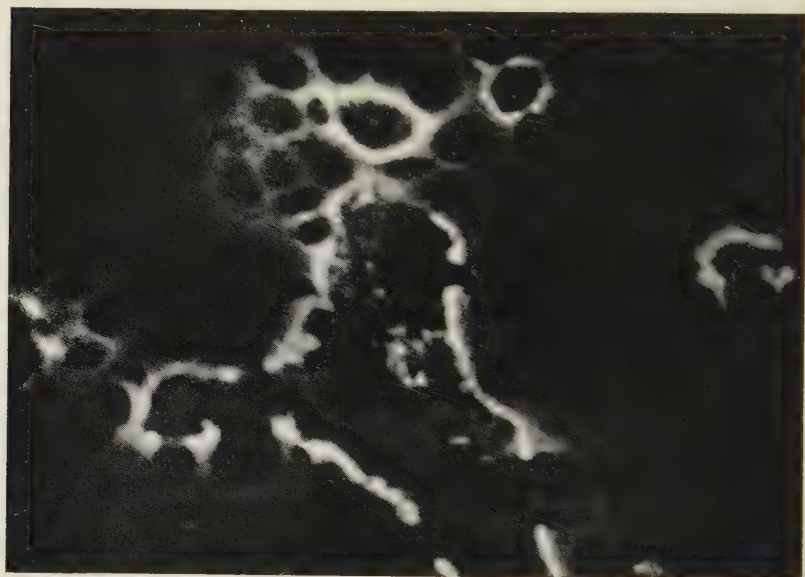
1. LES TUMEURS.

En utilisant l'antisérum aACE nous avons obtenu des images identiques sur toutes les tumeurs (Fig. 1 a-c).

La fluorescence était localisée presque exclusivement dans la membrane plasmique de la cellule donnant sur la lumière de la glande. La fluorescence était très intense et les images étaient indiscutables.

Les autres immunosérums ont donné des images tout à fait différentes : si les coupes ont été marquées par l'aCN une fluorescence forte surtout cytoplasmique a été observée qui faisait ressortir toute la

cellule ou des glandes entières sur un fond noir. Les images ressemblent à une grappe, si la glande est coupée longitudinalement et à une fleur sur des coupes transversales (Fig. 2 a et b).



Les mêmes coupes traitées par un aIE ont donné une image intermédiaire entre celle de type tumoral, c'est-à-dire la fluorescence de membrane et de type normal, qui est caractérisée par une fluorescence cytoplasmique. Les lames ont donc montré la fluorescence cytoplasmique combinée avec une fluorescence localisée dans la membrane pérircellulaire, mais sans qu'aucune partie de la membrane soit plus lumineuse (Fig. 3).

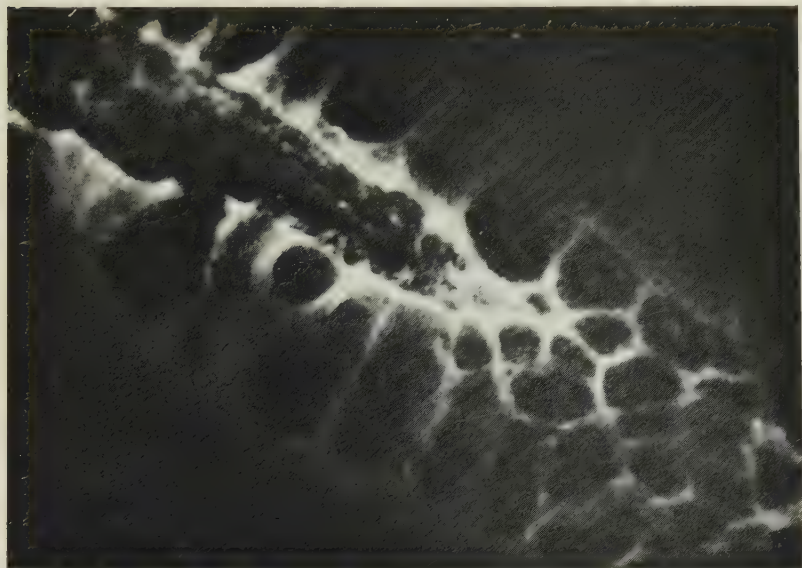


FIG. 1 a, b, c. — Coupes de tumeurs coliques.

On voit la positivité des membranes cellulaires bordant les lumières glandulaires.

Marquage avec un immunsérum aCE ($\times 400$).

Une image encore différente est obtenue, si les coupes sont marquées, à titre de contrôle avec un aIgG. Cette fois-ci la fluorescence se situe uniquement dans le tissu périglandulaire.

A faible grossissement une image « en filet » d'allure continue est observée qui, à fort grossissement, fait place à des images discontinues évoquant une localisation intracellulaire de la fluorescence (Fig. 4).

Le marquage des coupes par l'immunsérum antiglobuline de lapin fluorescent seul donne une fluorescence générale faible sans qu'une structure tissulaire ne soit particulièrement marquée.

La spécificité de l'image obtenue avec l'immunsérum aACE a été démontrée par l'expérience d'épuisement : l'antisérum aACE, complètement absorbé par l'antigène CE isolé, mis sur des coupes de tumeurs

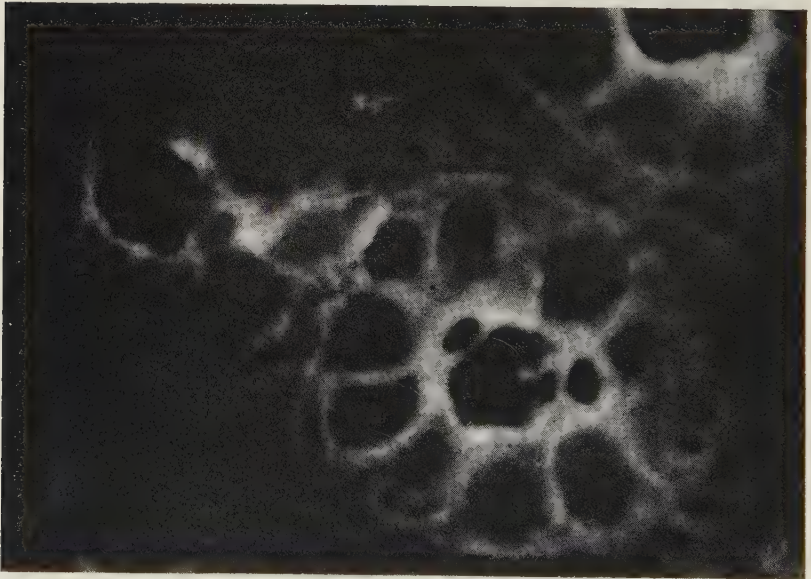
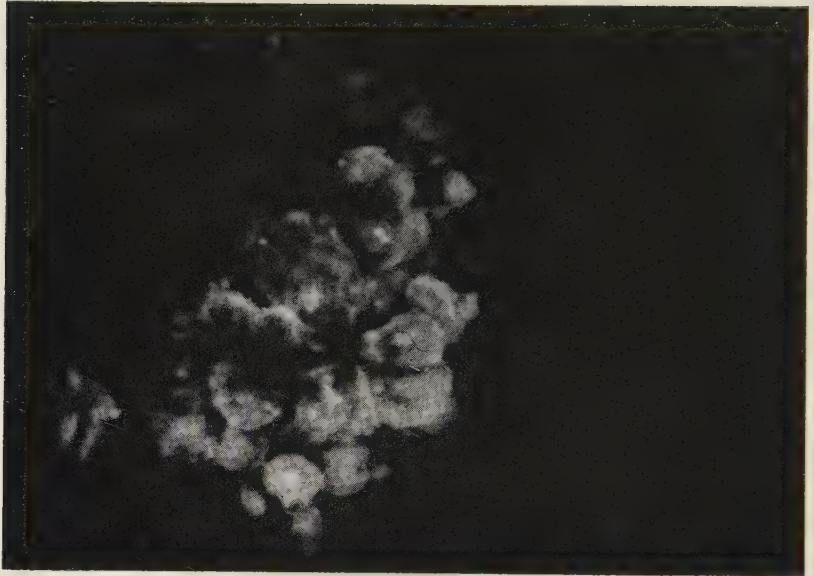


FIG. 2 a, b. — Coupe d'une tumeur colique marquée par aCN.
La glande est seulement partiellement positive. ($\times 400$).

ne donne aucune image caractéristique. Quand nous avons recolore la même coupe avec l'antisérum non épuisé, la fluorescence de membrane antérieurement décrite est de nouveau apparue, mais alors sur un fond plus brillant (Fig. 5).

2. L'INTESTIN FŒTAL.

Lorsque nous avons marqué des coupes d'intestin fœtal avec l'immunsérum aACE nous avons obtenu des images tout à fait comparables à celles des tumeurs : une fluorescence accentuant les membranes cellulaires bordant les petites lumières glandulaires. Il y avait aussi une très légère fluorescence cytoplasmique (Fig. 6 a et b).

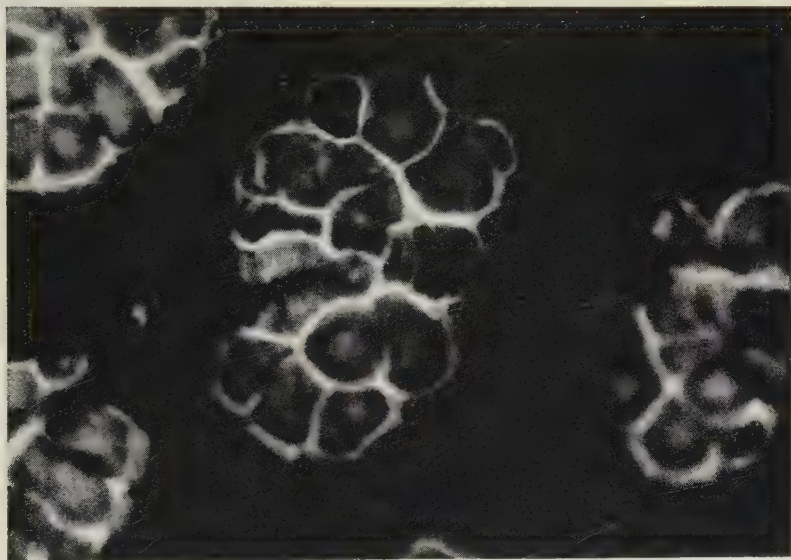


FIG. 3. — Coupe d'une tumeur colique marquée par un immunsérum aIE. La fluorescence accuse les membranes et l'intérieur de la cellule ($\times 400$).

L'intensité de la fluorescence est cette fois-ci faible en comparaison avec les images tumorales. L'origine fœtale de l'antigène CE a pu être confirmée de cette manière.

3. LA MUQUEUSE PÉRITUMORALE (prélevée à quelques centimètres de la tumeur).

On voit sur la figure 7 une glande qui est fluorescente seulement sur une partie de son contour. Elle voisine avec une glande positive et une négative. Une étude de la coupe suivante colorée avec les colorants histologiques usuels a montré la présence de cellules épithéliales atypiques dans les glandes qui prenaient totalement ou partiellement la

fluorescence. Ceci démontre la sensibilité de la méthode et justifie la classification de ce tissu comme « non tumoral » ou « péritumoral » plutôt que « normal ».

4. LA MUQUEUSE COLIQUE NON TUMORALE (prélevée loin de la tumeur).

A titre de comparaison nous avons examiné autant de coupes de colons considérés comme normaux, parce que histologiquement sans signe de malignité, que de tumeurs. Ces échantillons provenaient, rappelons-le, de colons enlevés pour un épithélioma. L'image de ces colons, marqués avec un antisérum aCN, donne une image de très grande luminosité. La fluorescence fait ressortir sur un fond sombre les glandes lieberkühniennes en entier, marquant autant le cytoplasme

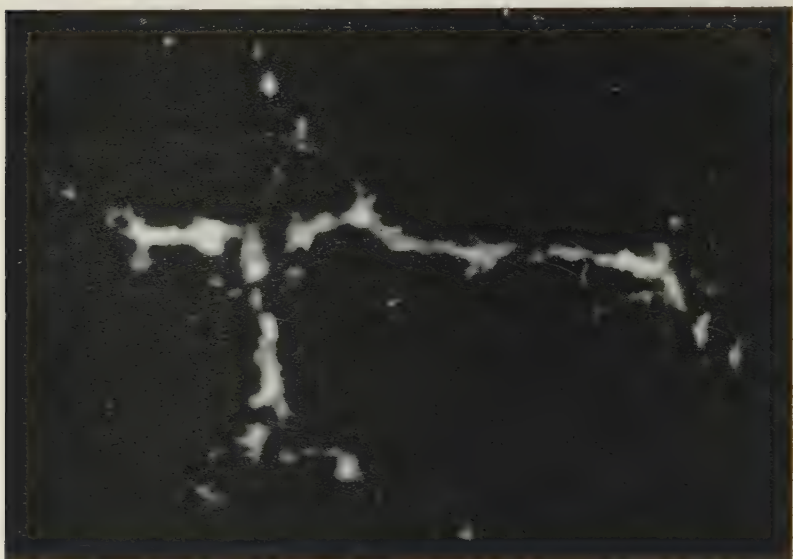


FIG. 4. — Coupe d'une tumeur colique marquée par un immunsérum anti IgG humaine. On voit une fluorescence des structures périglandulaires. Les glandes sont négatives.

que la membrane plasmique des cellules (Fig. 8 a). Toute différente est l'image obtenue par le marquage avec l'aIE. De nouveau les membranes sont fluorescentes (Fig. 8 b) mais sans accentuation d'un pôle cellulaire. Fait important, l'antisérum aACE marque quelques glandes, d'une façon analogue aux glandes tumorales, donnant une fluorescence de membrane limitée au pôle apical des cellules bordant la lumière glandulaire. L'étude histologique des coupes voisines n'a montré aucune anomalie.

5. LA MUQUEUSE COLIQUE NORMALE.

Le marquage des coupes du colon normal par l'aACE a donné des images non spécifiques, c'est-à-dire une fluorescence de toutes les structures du tissu y compris des glandes, identique à celle obtenue après marquage des coupes par un sérum de lapin normal. Il n'y a pas eu de fixation de l'aACE sur les membranes glandulaires.

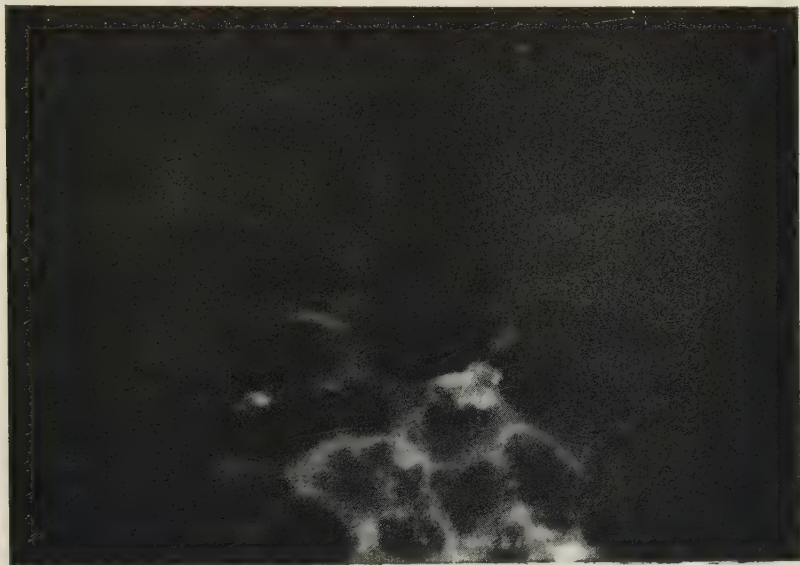


FIG. 5. — Coupe d'une tumeur colique marquée par un immunsérum aACE épuisé par le ACE. Il ne reste que la fluorescence spontanée du tissu ($\times 400$).

Discussion.

Les résultats obtenus en fluorescence sur les coupes de tumeurs coliques et d'intestin fœtal confirment la réalité de l'ACE et précisent sa localisation. Il semble d'après les images obtenues que l'antigène fait partie de la membrane plasmique de la cellule cancéreuse et plus précisément du pôle sécrétant des cellules glandulaires. Cette orientation vers la lumière de la glande suggère qu'il s'agit d'un antigène sécrété.

L'hypothèse est renforcée par quelques images d'une fluorescence granulaire se trouvant dans la lumière glandulaire.

Le fait que l'antigène CE est un antigène de la membrane cellulaire a été déjà signalé par GOLD et al. [52] sans que les auteurs aient signalé une orientation polaire de la fluorescence des membranes libres.

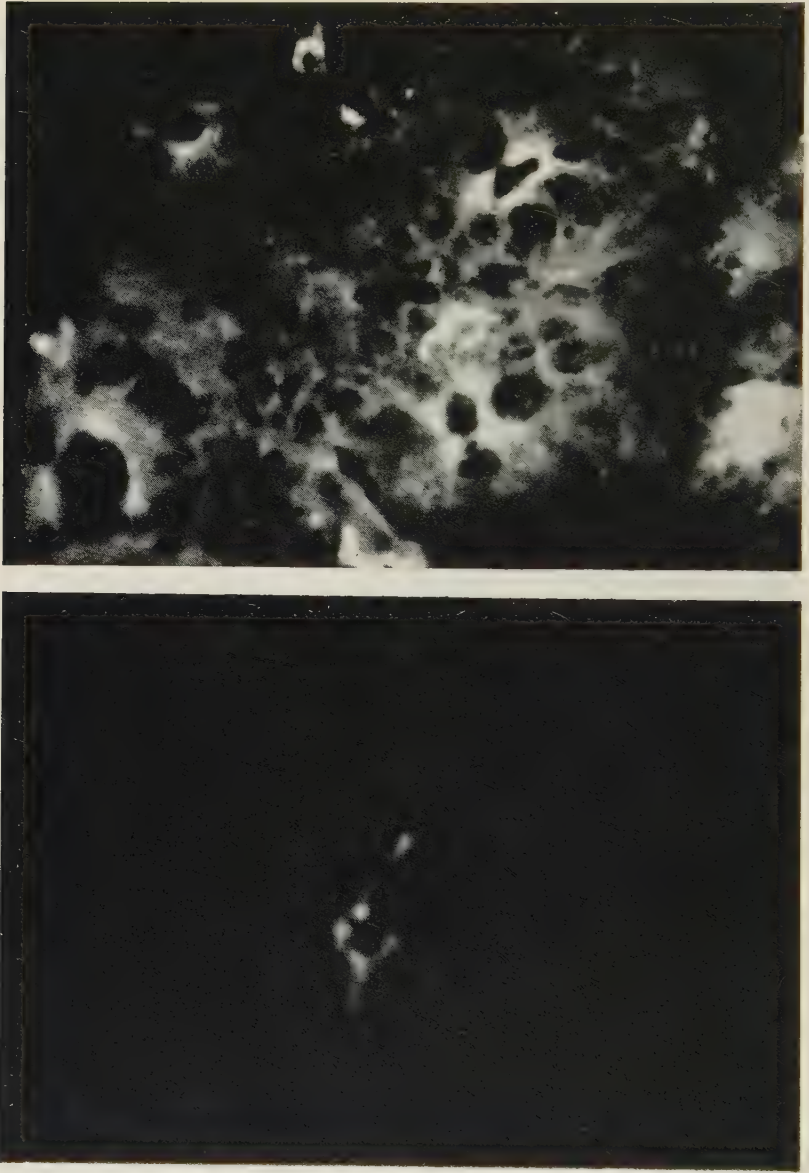


FIG. 6 a, b. — Coupes d'intestins fœtaux.

La fluorescence a la même localisation que dans la figure 1 a, b, c, mais est moins forte ($\times 400$).

En dehors des glandes tumorales, on trouve de l'ACE dans des cellules cytologiquement atypiques, et dans des cellules normales, mais provenant d'un intestin porteur d'un épithélioma. A l'inverse nous n'avons pas eu de réaction avec les cellules d'un intestin non cancéreux (qui en outre ne contenait pas d'antigène CE par l'étude immuno-chimique). Ceci montre que la fluorescence est une méthode bien plus sensible que les colorations classiques pour détecter des changements associés à la malignité.

Le fait que les tumeurs réagissent encore fortement avec l'antisérum aCN démontre que les antigènes normaux de la cellule ne sont pas tous disparus. Leur localisation est surtout dans le cytoplasme sans que la membrane en soit complètement privée. La fluorescence des cellules cancéreuses est moins uniforme que celle obtenue dans les cellules

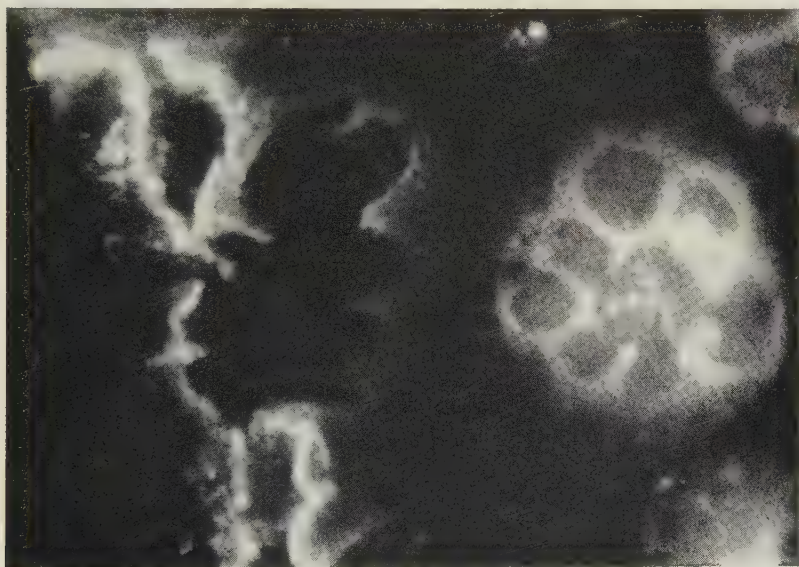


FIG. 7. — Coupe d'une muqueuse péri tumorale marquée par un aACE montrant une glande partiellement positive ($\times 250$).

du colon normal avec le même immunsérum ce qui peut indiquer une perte d'antigènes normaux. En utilisant la même technique (l'immunofluorescence) LORD [53] et NAIRN et al. [54,55] ont démontré aussi dans les tumeurs coliques humaines une disparition des antigènes spécifiques pour l'organe homologue normal.

L'origine embryonnaire de l'ACE a été démontrée d'une manière indirecte par le fait qu'on obtient une réaction positive des membranes cellulaires de l'intestin fœtal si on les traite avec un antisérum préparé

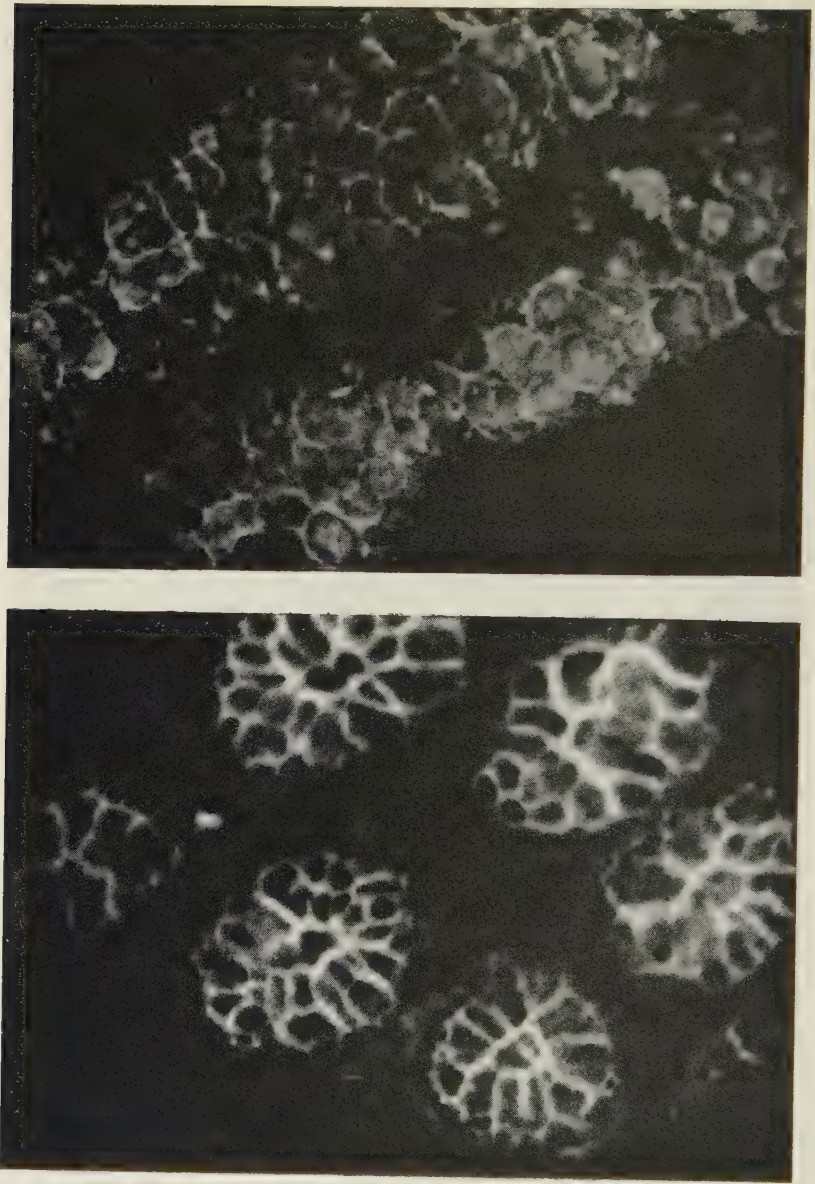


FIG. 8 a, b. — Coupes d'un colon non tumoral marquées avec un immun-sérum aCN (a) et avec un immun-sérum aIE (b). Dans le premier cas le cytoplasme est aussi fluorescent que les membranes tandis que dans le deuxième cas (b) les membranes sont plus fluorescentes. ($\times 400$).

contre un antigène venant d'un tissu adulte et cancéreux. La faible intensité de la fluorescence dans les images fœtales peut s'expliquer par le fait que l'antigène est moins abondant dans l'intestin fœtal que dans les tumeurs. Nous avons déjà fait cette constatation par l'étude immunochimique rapportée dans le chapitre précédent [56]. Il reste à savoir où est le lieu de synthèse de l'antigène et pourquoi le pôle apical de la cellule est marqué de préférence dans les cellules cancéreuses.

On peut avancer deux hypothèses : la première est que l'antigène synthétisé dans le cytoplasme est concentré dans la partie libre de la membrane avant d'être excrétée. La deuxième explication est une spécialisation de certaines zones de la membrane : l'antigène pourrait être synthétisé électivement dans la partie libre de la membrane cellulaire, ou produit dans toute la membrane, mais il serait masqué dans les zones accolées. Rappelons que de THÉ [57] étudiant des cellules sarcomateuses a pu démontrer que les propriétés de la membrane cellulaire n'étaient pas uniformes. Certaines activités enzymatiques étaient démontrables uniquement dans la partie accolée des membranes cellulaires. C'est un argument pour montrer la différence d'activité des membranes selon qu'elles sont libres ou accolées.

Les images obtenues avec l'antisérum $\alpha\gamma$ globulines humaines ressemblent à celles décrites par CRABBÉ et coll. [58]. Il s'agit du marquage des cellules productrices de globulines situées dans le tissu conjonctif entourant les cellules épithéliales.

DEUXIEME PARTIE.

CHAPITRE IV.

ÉTUDE DES ANTICORPS PRÉSENTS DANS LE SÉRUM DES MALADES ATTEINTS DE CANCERS DIGESTIFS.

Etant donné que des travaux déjà publiés [59-62] ont mis en évidence dans le sérum des malades cancéreux des anticorps antitumeur nous nous sommes demandé si chez les patients ayant des tumeurs coliques nous trouverions dans leur sérum des anticorps circulants dirigés contre des extraits de cette néoplasie.

Nous avons d'abord étudié la présence d'anticorps en utilisant des extraits salins de tumeurs comme antigène [63, 64]. Ensuite nous avons employé l'antigène semi-purifié afin de mieux déterminer la spécificité des anticorps décelés.

I. — Matériel et Méthodes.

A — Étude de l'extrait salin tumoral (TC).

1. LES SÉRUMS.

Nous avons étudié les sérums venant des malades suivants :

a) 54 patients ayant une tumeur maligne du colon. Toutes les tumeurs ont été classées histologiquement comme épithéliomas glandulaires à quatre exceptions près, soit un papillome vilieux et trois épithéliomas malpighien.

b) 83 patients ayant des cancers de divers autres organes : estomac, poulmon, glande mammaire, œsophage, foie, pancréas.

c) 53 patients ayant des maladies intestinales non cancéreuses, surtout des rectocolites ulcéreuses, des diarrhées chroniques, des parasitoses, des papillomes bénins.

d) 34 individus sains ou ayant des affections banales.

2. LES TISSUS.

85 tumeurs ont été utilisées pour cette étude, dont 62 étaient des cancers coliques (TC), 20 gastriques (TE), 2 rénaux et 1 hépatique. Comme tissus normaux nous avons utilisé 10 colons, 4 estomacs, 2 reins et une rate. Nous avons aussi pris les organes fœtaux suivants : intestins, estomacs, rates, poumons, cœurs, reins.

3. LES EXTRACTIONS.

De tous ces tissus nous avons préparé des extraits salins comme précédemment décrit (Chap. 1). *Des extractions phénoliques* ont été faites à partir de quelques tumeurs coliques et colons normaux. Nous avons employé la méthode de WESTPHAL et al. [65] modifiée par PERLMANN et BROBERGER [66].

Le broyat de tissu a été extrait avec un volume égal de phénol à 90 % pendant 45 minutes à 65°C avec agitation mécanique. Après centrifugation la couche aqueuse a été éliminée et l'extraction répétée. Après précipitation par 3-4 volumes d'alcool éthylique à 90 % additionné de quelques grammes d'acétate de sodium les fractions aqueuses ont été lyophilisées.

4. PRÉPARATION D'UNE FRACTION MICROSOMIALE.

Une sous-fraction cellulaire microsomiale a été préparée à partir d'un broyat de CN. La méthode employée a été la centrifugation différentielle dans une solution de sucrose 0,25 M. Les microsomes ont été obtenus dans le culot 35.000 g (1 = 60 minutes) avec une centrifugeuse Spinco, Model L. Le contrôle de la préparation en microscopie électronique a démontré que la fraction n'était pas rigoureusement pure mais contenait quelques autres éléments subcellulaires y compris des mitochondries.

5. LES TECHNIQUES D'HÉMAGGLUTINATION PASSIVE.

Pour la mise en évidence et la titration des anticorps contenus dans le sérum des malades nous avons utilisé la technique d'hémagglutination de BOYDEN [67]. Des globules rouges de mouton ont été sensibilisés par des extraits tissulaires lyophilisés à une concentration de 1,5 mg protéines/ml.

Les anticorps réagissant avec les extraits phénoliques ont été mis en évidence par la méthode d'hémagglutination de KEOGH et al. [68]. L'antigène phénolique donnait une sensibilisation optimale des globules rouges non traités à une concentration de 250 µg/ml en poids sec. Dans les deux techniques d'hémagglutination nous avons employé un tampon phosphate 0,15 M, pH 7,4. Pour les lavages des globules rouges et les dilutions de sérums (à partir de 1 sur 10) 1 % de sérum normal de lapin a été ajouté à ce tampon.

6. L'ABSORPTION DES SÉRUMS.

Les sérums ont été absorbés par :

a) des extraits des organes fœtaux et adultes normaux suivants : estomac, rein, foie, rate, colon. Les extraits ont été utilisés à des concentrations allant jusqu'à 180 mg de protéines par ml de sérum.

b) des extraits de tumeurs du colon, du rein, de l'estomac, à des concentrations allant jusqu'à 100 mg de protéines par ml de sérum.

c) un mélange de stroma de globules rouges de différents groupes sanguins à raison de 90 mg/ml de sérum.

d) des bactéries tuées : E. Coli, Proteus, staphylocoques et streptocoques (Institut Pasteur) à une concentration de 6.10^9 /ml de sérum.

7. TRAITEMENT ENZYMATIQUE DES EXTRAITS TISSULAIRES.

Les extraits salins de tissu ont été traités alternativement par la trypsine (1) à pH 7,3, la pepsine (1) à pH 2, et l'amylase (1), l'élastase (1), la DNase (2), la RNase (2) et la papaïne (3), en présence de cystéine (4), toutes à pH 7. Le temps d'incubation était de 12-24 heures à 37°C avec une concentration d'enzyme de 1 %. L'activité enzymatique a été arrêtée par addition d'EDTA ou de DFP (Les enzymes étaient des enzymes d'origines commerciales et leur pureté n'a pas été contrôlée).

B — Étude avec l'extrait semipurifié (TCS₁P).

Cette étude a été particulièrement difficile surtout du point de vue technique, ce qui explique le petit nombre de résultats rapportés. Nos résultats portent sur 59 sérums seulement. Nous avons divisé les sérums en 2 groupes :

Le Groupe 1 était constitué de 44 sérums provenant de patients ayant un cancer du tube digestif.

Le Groupe 2 comprenait 15 sérums provenant de cancer d'autres organes (3) ou ayant des maladies digestives bénignes (11, dont 6 ulcères gastriques) ; un sérum a été prélevé chez un malade cirrhotique.

La technique employée a été l'hémagglutination passive selon la méthode d'AVRAMEAS et al. [69]. Dans cette méthode l'antigène est couplé aux globules rouges par l'intermédiaire d'une solution de glutaraldéhyde à 25 %.

Des essais préliminaires ont été nécessaires pour déterminer les conditions optimales de la réaction comprenant :

- La concentration de l'antigène.
- Le temps de sensibilisation.
- L'importance de la concentration du glutaraldéhyde.

Tous les tests ont été effectués en microméthode utilisant des plaques de plastique (Greiner, Bishwiller, France) et des micropipettes automatiques Marburg (Eppendorf, Netheler et Hinz, GmbH — Hamburg).

L'extrait TCS₁P a été préparé suivant la méthode décrite plus haut (Chap. I).

(1) Sigma Chemical Company, St Louis, MO, U.S.A.

(2) Choay, Substances Biochimiques, Paris.

(3) Worthington, Biochemical Corporation, Freehold, New-Jersey, U.S.A.

(4) Prolabo, Paris.

II. — Résultats.

A — Les titres obtenus en hémagglutination avec les extraits salins.

Le tableau I montre les résultats obtenus avec les sérums des 4 groupes de malades en utilisant des globules rouges sensibilisés avec des extraits salins de TC.

Il est évident que des titres élevés se retrouvent plus souvent dans le groupe de sérums provenant de malades ayant un cancer colique que dans les autres groupes. Ainsi 52 % des sérums de ce premier groupe ont eu des titres égaux ou supérieurs à 1/160, par rapport à 17 % pour les cancers d'autres organes, 13 % pour les maladies digestives non cancéreuses, et seulement 3 % (1 cas sur 34) pour les maladies diverses.

Dans le cas des maladies digestives non cancéreuses 5 des 7 sérums à titre élevé ont été prélevés chez des patients souffrant d'une rectocolite hémorragique. BROBERGER et PERLMANN [70] ont décrit chez ces malades des autoanticorps agglutinant des globules rouges sensibilisés par les extraits phénoliques du colon normal. Nous nous sommes donc posé la question de savoir s'il s'agissait des mêmes anticorps que ceux que nous avons trouvés. Nous avons alors étudié comparativement les deux systèmes avec 16 sérums de colite ulcéreuse et 13 de cancer colique.

Les antigènes ont été les extraits :

- salins de tumeur colique (TC).
- phénoliques de tumeur colique (PT).
- phénoliques de la muqueuse colique normale (PN).

Nous n'avons pas pu déceler une relation évidente entre les titres d'hémagglutination donnés par ces mêmes sérums avec les différents antigènes (Tableaux II et III). Certains sérums donnent un titre élevé pour l'antigène TC et faible pour un autre (PN ou PT). Les sérums, qu'ils soient de recto-colite ou de cancer, donnant le même titre avec PT (1/40) donnent des titres très variables avec TC (1/640 à 1/10).

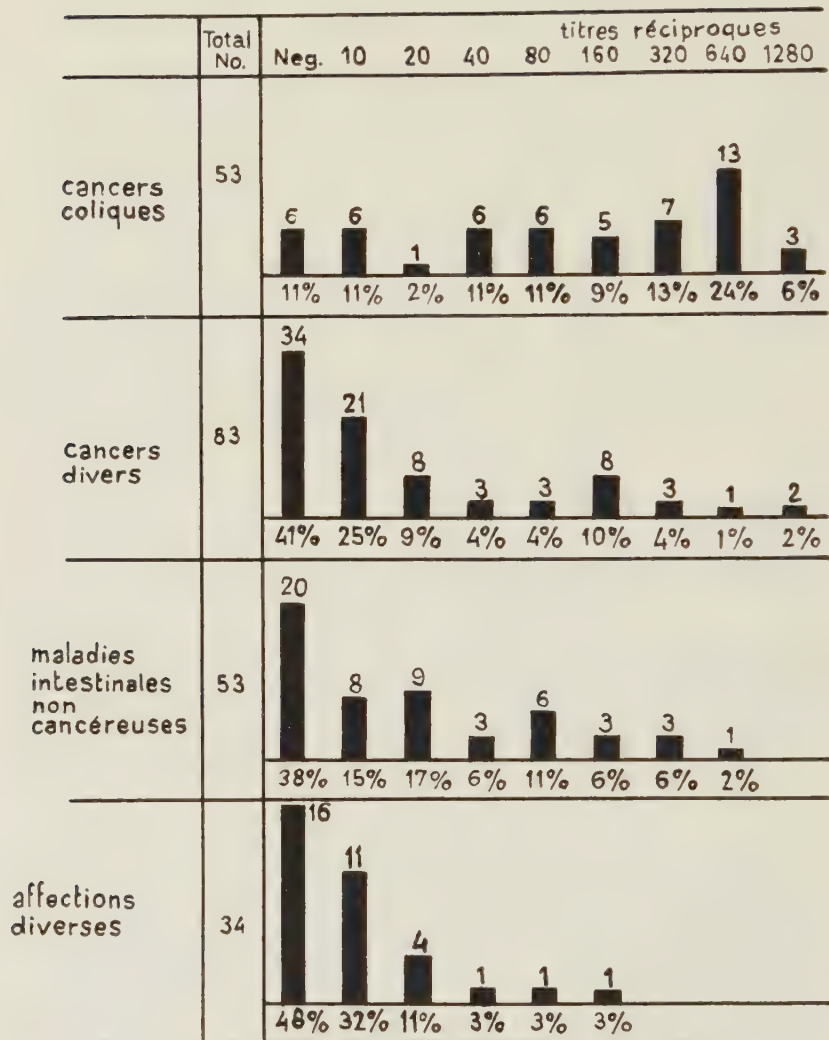
B — Études de l'absorption des sérums.

3 sérums donnant un titre supérieur à 1/100 avec les extraits salins TC ont été choisis pour un essai d'absorption avec des extraits salins de tissus normaux et fœtaux, des stromas érythrocytaires, des bactéries et une fraction microsomiale de CN. Les résultats sont montrés dans les tableaux IV et V.

a. *L'absorption avec les extraits normaux* des organes : estomac, rein, colon, rate et foie à une concentration de 30 mg de protéines par ml de sérum a diminué le titre d'hémagglutination d'une ou deux dilutions. Avec 120 mg/ml d'extrait CN le titre est devenu négatif. A une dilution près il en est de même avec l'extrait EN. Par contre, l'absorption par l'extrait splénique n'a pas diminué les titres d'une manière significative.

TABLEAU I.

*Titres réciproques d'hémagglutination
donnés par les sérums de malades avec des globules rouges
sensibilisés par des extraits salins de TC.*



b. *L'absorption par les extraits tumoraux.*

L'activité hémagglutinante de sérums a été épuisée avec 30 mg d'extrait TC par ml de sérum. Pour les cancers des autres organes il a fallu jusqu'à 3 fois cette quantité pour arriver au même résultat.

TABLEAU II.

Titres réciproques des sérums de rectocolite hémorragique avec les antigènes TC (extraits salins) PT (extrait phénolique) de tumeurs coliques et PN (extrait phénolique) de colon normal.

N° des sérums	Antigènes		
	TC	PT	PN
1	640	—	160
2	320	10	160
3	160	80	10
4	160	20	160
5	160	40	80
6	80	20	20
7	40	20	10
8	40	80	40
9	20	20	40
10	20	10	40
11	20	160	160
12	20	10	40
13	10	10 $\pm$	40
14	0	0	80
15	0	20	160
16	0	20	20

TABLEAU III.

Titres réciproques des sérums de cancers coliques avec les 3 différents antigènes.

N° des sérums	Antigènes		
	TC	PT	PN
1	640	10	20
2	160	20	40
3	320	10	20
4	640	10	40
5	640	0	80
6	20	20	80
7	80	10	40
8	640	20	40
9	320	80	20
10	40	80	80
11	80	80	40
12	640	40	40
13	10	40	40

Les titres des anticorps contenus dans les mêmes sérums agglutinant les globules rouges sensibilisés avec des extraits phénoliques de tumeurs coliques (PT) ont été diminués d'une manière non significative par l'absorption par le TC.

c. *L'absorption avec les extraits d'organes fœtaux* utilisés à une concentration de 120 mg/ml de sérum a négativé tous les titres.

TABLEAU IV.

Changement de titres après absorption par des extraits de différents tissus : TC-tumeur colique ; CN-colon normal, TR-tumeur rénale, RN-rein normal, RA-rate ; FO-foie ; les quantités d'antigène représentant les concentrations minimales nécessaires pour obtenir une absorption complète ou la quantité maximale employée (pour RA et FO).

Sérums	Titre avant absorption	Antigène (concentration minimale)							
		TC	CN	TE	EN	TR	RN	RA	FO
		30 mg/ml	120 mg/ml	100 mg/ml	120 mg/ml	120 mg/ml	170 mg/ml	180 mg/ml	180 mg/ml
1	320	0	0	0	10 ±	0	0	160	10
2	640	0	—	0	0	0	10 ±	160	80
3	640	0	10 ±	—	0	0	10 ±	—	—

d. *L'absorption par la fraction microsomiale* de la muqueuse colique normale a été faite et a été complète pour une concentration de 15 mg/ml de sérum.

e. *L'absorption des sérums par les corps bactériens* n'a pas changé les titres d'une manière significative (tableau V).

TABLEAU V.

Titres de sérums de cancers coliques après absorption par différentes bactéries.

Sérums	Titre avant absorption	Bactéries (6×10^9 /ml)				
		Staph.	Strep.	Coli.	Prot.	Prot. + coli.
1	320	80	160	160	80	160
2	160	160	160	80	80	160
3	320	80	160	80	80	320

C — Traitement enzymatique d'antigène.

Les globules rouges ont été sensibilisés avec des préparations de TC traitées par divers enzymes. Si le titre d'hémagglutination a diminué de deux dilutions ou plus on l'a considéré comme indiquant une sensi-

bilité partielle de l'antigène à l'enzyme en question. Si ce titre est resté inchangé, l'antigène est considéré comme résistant à l'enzyme utilisé (Tableau VI).

D Les titres obtenus en hémagglutination avec l'antigène TCS₁P.

1. Les études préliminaires faites sur la sensibilisation des globules rouges ont montré qu'il existe une zone de concentration d'antigène donnant les mêmes résultats. L'utilisation de 1 mg/ml ou 10 mg/ml de TCS₁P n'entraînait qu'une variation insignifiante des titres obtenus avec les mêmes sérums. Les concentrations plus fortes ou plus faibles ont amené des réactions difficiles à interpréter. L'antigène étant difficile à obtenir nous avons trouvé préférable de l'utiliser à une concentration de 1 mg/ml.

TABLEAU VI.
*Effet du traitement enzymatique d'antigène
sur le titre d'hémagglutination.*

Enzyme	Effet sur le titre d'hémagglutination
Trypsine.....	Nul
Pepsine.....	Nul
Amylase 10 %.....	Partiel
Amylase 1 %.....	Nul
Elastase.....	Nul
Papaine (+ cystéine).....	Partiel
DNase.....	Partiel
RNase.....	Partiel

2. Une prolongation du temps d'incubation (normalement de 30 minutes) n'a pas eu d'effet sur la réaction en ce sens que les titres restaient constants même si la sensibilisation se faisait pendant 1 heure ou 2 heures.

3. L'addition du glutaraldéhyde à 25 % fut nécessaire pour fixer l'antigène à faible concentration (1 mg/ml). Pour des concentrations élevées le coupleur ne semblait pas être indispensable. Ceci semble indiquer une double nature de l'antigène (protéine - polysaccharide).

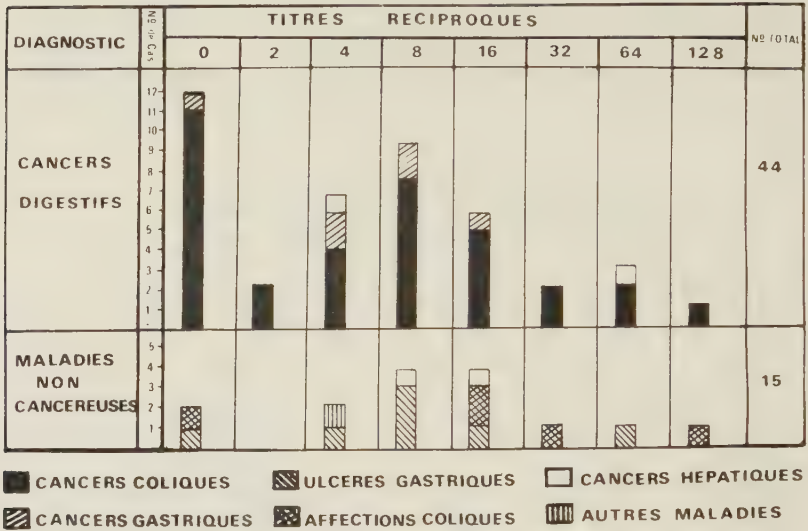
Les résultats obtenus avec les différents groupes de sérums de malades sont présentés dans le tableau VII.

Avec l'antigène semipurifié nous n'avons jamais obtenu de titres élevés, comparables aux titres des sérums qui ont été testés avec l'extrait brut. En ce qui concerne les cancers digestifs seulement 10 % des sérums ont donné un titre appréciable (égal ou supérieur à 1/64). Par contre le pourcentage de sérums ne donnant aucune activité hémagglutinante est très élevé, soit de 30 %. Plus de la moitié des sérums (60 %) ont eu un titre faible (contre 26 % dans la série des sérums testés avec l'antigène brut).

D'autre part certains sérums du groupe de contrôle donnent aussi des résultats positifs. Dans ce groupe un sérum a un titre de 1/64, un autre de 1/128.

TABLEAU VII.

Titres réciproques d'hémagglutination donnés par les sérums de malades avec des globules rouges sensibilisés par des extraits semipurifiés de TC.



Discussion.

Les résultats obtenus en hémagglutination passive avec les différents sérums de malades indiquent la présence d'anticorps dirigés contre des substances tissulaires. Ces substances ne se trouvent pas seulement dans les tumeurs coliques mais aussi dans le tissu normal et fœtal correspondant. Des études d'absorption avec des extraits de tissus normaux et tumoraux ont démontré que l'antigène est présent en quantité beaucoup plus grande dans les extraits de tumeurs coliques que dans ceux de la muqueuse colique normale. La différence entre ces deux extraits semble être purement quantitative.

En analysant les résultats obtenus avec comme antigène les extraits salins tumoraux, une incidence plus grande des titres élevés (1/160) chez des malades ayant un cancer colique est évident (52 %). Dans le groupe de contrôle on ne trouve que 3 % des sérums ayant ces mêmes titres. Ceci pourrait suggérer une réponse immunologique de l'organisme contre la tumeur. D'autant plus que les tests d'absorption avec

des bactéries et du stroma n'ont pas renforcé l'autre possibilité que des isoanticorps anti groupe sanguin ou des anticorps anti bactéries seraient à l'origine de ces réactions.

Si les anticorps circulant sont la conséquence d'une réaction immunologique du malade, il faut alors expliquer pourquoi 22 % des sérums de patients souffrant d'un cancer colique ne donnent qu'un titre très faible ou nul. Plusieurs facteurs peuvent être tenus pour responsables : le stade de la néoplasie, le traitement du malade, son état de résistance immunologique. D'autres investigateurs ont étudié ces problèmes principalement cliniques de très près. GRAHAM et GRAHAM [62] ont rapporté qu'il était très difficile de démontrer des anticorps circulants anti tumeur chez des malades ayant un cancer étendu ou nécrotique. GOLD a fait la même observation [71]. Dès qu'un cancer était métastatique, plus aucune réaction n'était observée. Si des anticorps sont produits par des malades, ils peuvent être fixés sur les tumeurs ou bloqués par des antigènes circulants. D'un autre côté une tumeur bien localisée pourrait libérer peu ou pas d'antigènes et ainsi ne pas stimuler la formation d'anticorps.

En fait de nos 12 sérums de TC ayant un titre bas ou nul, un provenait d'un patient ayant un carcinome villosus dégénéré, deux de tumeurs bien localisées et deux étaient des cancers nécrotiques.

En ce qui concerne le traitement il est bien connu que les agents chimiothérapeutiques carcinostatiques, sont comme les rayons X, cytotoxiques pour les leucocytes, et dépriment la formation d'anticorps. Quelques auteurs comme KONDO et ISCHIHASHI [72] ont démontré les effets nocifs de certains de ces agents chez l'homme et ont montré que leur administration à l'animal peut conduire à l'abolition des mécanismes de défense. Cette explication n'est valable que pour ceux de nos malades ayant reçu un traitement chimiothérapeutique, ce qui n'est pas le cas pour tous.

Nous n'avons pas non plus trouvé une augmentation du taux d'anticorps à la suite d'une radiothérapie ou d'une thérapeutique chirurgicale ainsi qu'il a été rapporté par FINNEY et coll. [73] et par GOLD [71].

14 sérums ayant un titre élevé d'héماغglutination provenaient de malades ne souffrant pas d'un cancer colique. Les 2 sérums ayant les titres les plus élevés venaient respectivement de malades ayant l'un des métastases hépatiques d'origine indéterminée, l'autre des métastases œsophagiennes d'un cancer mammaire. Pour les autres cas, 9 étaient des cancers digestifs et 3 des épithéliomas pulmonaires.

La même origine embryonnaire (endodermique) peut servir à expliquer les titres élevés des 9 cas de cancers digestifs et ceux de cancers pulmonaires.

Les titres élevés d'héماغglutination retrouvés chez les malades ayant une colite ulcéreuse nous semblent avoir un intérêt particulier, car il est possible qu'ils soient l'indication d'un processus de transformation maligne. On observe en effet une fréquence accrue de cancers coliques chez ces malades, le pourcentage variant selon les auteurs de 0,6 à 19 % [74-76].

Les études comparatives effectuées avec des extraits salins et phénoliques de colon normal et de cancer du colon et des sérums de malades ayant une colite ulcéreuse ou un cancer colique montrent que l'on doit invoquer deux systèmes antigéniquement différents, puisque les titres des sérums vis-à-vis de chaque extrait sont sans relation évidente. D'ailleurs l'absorption par ces extraits salins laisse pratiquement intouchés les anticorps hémagglutinant les globules sensibilisés avec les extraits phénoliques.

Considérant les titres élevés des réactions avec certains sérums de malades sans cancer colique et les titres faibles ou négatifs de sérums provenant de patients ayant un cancer du colon il nous semble que le test d'hémagglutination n'a aucune valeur diagnostique.

Nous sommes en contradiction avec GOLD [71, 77] en ce qui concerne les résultats obtenus en hémagglutination passive avec l'antigène TCS₁P. Celui-ci a rapporté des titres très élevés (allant jusqu'à 1/2360) dans 30 des 43 sérums testés de malades ayant un cancer non métastatique du tube digestif. Il n'a jamais eu de réaction positive avec des sérums d'autres affections malignes et seulement 2/39 des sérums de malades ayant des maladies non cancéreuses étaient positifs. Ceci est d'autant plus étonnant que dans d'autres études sur des systèmes similaires une spécificité aussi stricte n'a jamais été observée.

La différence de titres obtenus en faisant réagir des globules rouges sensibilisés par un extrait brut de TC ou par un extrait semipurifié, avec des sérums du premier groupe (cancer colique) s'explique peut-être par le fait que notre TCS₁P était très peu contaminé par des composants normaux cellulaires. Ceci renforcerait alors notre hypothèse avancée à propos des résultats obtenus avec l'antigène brut, à savoir que les anticorps mis en évidence sont essentiellement dirigés contre des substances normales. Par conséquent nous devons conclure que nous ne sommes pas capables de démontrer la présence d'anticorps circulants contre des antigènes spécifiques de tumeurs coliques.

Néanmoins nous avons retrouvé des anticorps, mais leur développement peut-être attribué à des constituants normalement séquestrés dans les cellules et libérés dans la circulation lors de la nécrose due à la cancérisation et stimulant une réponse immunologique. Ceci expliquerait que ces anticorps peuvent réagir avec et être absorbés par des tissus normaux et fœtaux.

La nature de l'antigène (ou des antigènes) ne nous est pas connue.

DISCUSSION.

1. Première partie.

L'objet de notre thèse a été de démontrer l'existence d'un antigène spécifique de tumeurs intestinales humaines — termes audacieux quand il s'agit d'un antigène présent dans le fœtus —.

Il convient alors de préciser ce que nous entendons par « spécifique » : c'est un antigène présent dans le tissu tumoral et (apparemment) absent du tissu homologue normal et des autres tissus nor-

maux. En effet, nous n'avons pu détecter cet antigène CE dans le tissu normal avec les méthodes employées. Toutefois, rien ne prouve qu'il n'y soit pas présent mais en quantité si infime qu'il échappe à nos investigations (le cas serait analogue à celui de certains types rares de globulines myélomateuses dans le sérum).

Admettre l'hypothèse que l'ACE serait présent à l'état de traces dans le tissu normal et très augmenté dans le cas de cancérisation nous semble encore compatible avec sa spécificité. Nous croyons donc pouvoir à juste titre appeler notre antigène spécifique.

Il nous faut ensuite soulever un autre problème, celui de l'origine et du rôle possible de cet antigène. Nous avons démontré que l'ACE est une protéine normalement présente dans le tissu intestinal fœtal, mais nous ignorons à quel moment de la gestation commence la synthèse de cette protéine. Cependant il semble qu'elle soit produite par des cellules déjà partiellement différenciées, si l'on en juge d'après son apparition dans la tumeur d'origine endodermique et sa présence dans les organes fœtaux : par immunofluorescence nous avons localisé très précisément l'antigène dans des cellules intestinales fœtales, à un stade de l'évolution fœtale où les cellules sont bien différenciées montrant ainsi une spécialisation déjà marquée de ces cellules. La présence de cet antigène dans certains organes fœtaux et non dans d'autres (compte-tenu de la sensibilité des techniques employées) renforce notre théorie selon laquelle seules les cellules embryonnaires à un certain stade de différenciation contiennent cet antigène.

Le rôle de cet antigène nous est complètement inconnu. En se basant sur la croissance rapide, propriété caractéristique commune aux deux tissus, fœtal et cancéreux, on peut penser qu'il y joue un rôle. La disparition de l'antigène à la fin de la gestation serait un argument en faveur de cette hypothèse, qui ne peut cependant être retenue, car elle ne tient pas compte des néoplasies bénignes à croissance parfois rapide qui ne contiennent pas pour autant l'ACE.

Le fait que l'antigène est une glycoprotéine, qui résiste assez bien à la chaleur, évoque les substances de groupes sanguins qui ont les mêmes caractéristiques. On pourrait alors poser la question, si l'antigène n'en est pas un précurseur. Nous ne sommes pas en mesure de répondre à cette question. Toutefois la localisation cellulaire de l'antigène (montré par immunofluorescence) n'était pas cytoplasmique comme il est connu pour les substances de groupes sanguins, mais bien sur les membranes plasmiques des cellules glandulaires.

L'apparition de cette protéine fœtale à l'état adulte est donc liée à la cancérisation plutôt qu'à la formation tumorale. Quelle explication peut-on donner à ce phénomène ? On peut en envisager trois :

1) On peut réinvoker l'ancienne théorie de COHNHEIN [78] qui impute l'origine des tumeurs malignes à des esclaves des cellules restées à l'état embryonnaire au sein de tissus adultes, et qui retrouvent leur activité après une agression. Si on peut encore discuter cette théorie pour certaines tumeurs embryonnaires comme le tératome, où réapparaît souvent une protéine fœtale, il ne nous semble pas possible d'envisager une telle théorie pour notre système.

2) Une autre hypothèse s'offre, celle qui repose sur la théorie des mécanismes régulateurs de la synthèse des protéines de JACOB et MONOD [79]. Ces auteurs ont postulé que c'est l'abolition d'un mécanisme de répression déterminant la différenciation de la cellule qui est la cause de la transformation maligne. Appliqué à notre cas, l'ACE serait alors une protéine dont la synthèse est réprimée à la fin de la gestation, et ne reprend qu'en cas de cancérisation. Le répresseur serait alors détruit par un agent chimique, physique, viral ou autre. Cette hypothèse certes séduisante n'est malheureusement pas prouvée. Aussi peut-on invoquer ici les thèses qui envisagent plutôt une régulation positive, où la nouvelle synthèse de la protéine serait due à un inducteur, qui pourrait être d'origine physique ou virale, et qui agirait en se liant éventuellement à un activateur.

En fait, très peu de choses sont connues sur la régulation de la synthèse des protéines dans les organismes supérieurs.

3) Une autre possibilité, plus immunologique mais peu vraisemblable, serait d'envisager la suppression de la synthèse de l'antigène par une production constante d'anticorps, mais même s'il existait chez les malades cancéreux des anticorps contre l'ACE, leur pouvoir de blocage serait vite débordé par la croissance tumorale rapide. Le seul avantage de cette hypothèse est la possibilité d'imaginer un modèle expérimental susceptible de la soutenir ou de l'infirmer. Si les anticorps jouent un rôle régulateur, en leur absence on devrait trouver dans les tumeurs en culture un taux d'antigène supérieur à celui trouvé dans des tumeurs chirurgicales. Or, nous savons que dans les tumeurs coliques maintenues en culture organotypique par le Pr. WOLFF, l'ACE est synthétisé, mais à un taux plus faible, malgré l'absence complète de sérum et de cellules productrices d'anticorps [80]. Ce résultat serait suffisant pour infirmer notre hypothèse mais d'autres facteurs pourraient jouer : des expériences d'IRLIN et al. [81] ont montré que l'hépatome en culture peut perdre sa capacité de synthétiser l' α_1 -foetoprotéine sans pour autant perdre sa malignité. Il en est peut-être de même pour les tumeurs humaines en culture. Ce dernier exemple illustre bien la complexité de ce genre de recherches.

Compte-tenu des limites imposées par le choix des techniques employées nous pouvons conclure que l'antigène que nous avons décrit est spécifique de l'état cancéreux et plus précisément spécifique de tumeurs digestives.

2. Deuxième partie.

Le résultat de l'étude des anticorps présents dans le sérum des malades cancéreux est dans son ensemble décevant. Nous avons espéré trouver des anticorps dirigés contre l'ACE, mais nous avons échoué. Les anticorps décelés étaient dans leur ensemble d'une spécificité médiocre et de ce fait sans intérêt. Leur rôle biologique semble d'autant plus douteux que nous les avons décelés le plus souvent chez les cancéreux confirmés. De plus les anticorps semblent dirigés contre des constituants cellulaires du tissu homologue normal adulte, car ils

sont absorbables par ces constituants. Pour trouver une certaine spécificité dans ces réactions il faudrait postuler chez l'homme la théorie de l'oncogénèse virale. On pourrait alors invoquer les observations faites chez les animaux [82], à savoir que les antigènes cellulaires de transplantation liés aux virus oncogènes ne sont pas nécessairement limités aux tumeurs qu'ils ont provoquées ou auxquelles ils sont associés, car ils peuvent se trouver aussi dans les tissus apparemment normaux. Au même titre les réactions « faussement positives » s'expliqueraient alors comme des réactions contre les antigènes produits par un virus latent.

Il ne faut peut-être pas attacher trop d'importance aux titres souvent très faibles d'anticorps trouvés dans les sérums de malades car ce peut-être un problème strictement technique. L'hémagglutination passive, à laquelle nous avons eu recours pour cette étude est particulièrement délicate. Nous l'avons choisie parce que la sensibilité de cette méthode vient tout de suite après celle de la radioactivité et de la fluorescence.

Le principe de la technique implique la « sensibilisation » d'un porteur convenable avec l'antigène soluble. Ce porteur ne participe pas à la réaction, mais augmente seulement la sensibilité de détection de l'anticorps. Les érythrocytes doivent être traités pour augmenter leur capacité de fixer les protéines. Les difficultés viennent du choix de ce traitement (du coupleur), qui est primordial pour l'intensité et la netteté de la réaction. En effet, toutes les protéines ne se fixent pas de la même manière avec un coupleur donné. Nous ne sommes pas toujours sûrs d'avoir trouvé, après de nombreux essais, le système idéal pour notre antigène. On peut aussi expliquer les titres faibles des anticorps par leur fixation sur la tumeur. Nous n'avons pas d'argument en faveur de cette théorie.

Pourquoi, alors, ne pas abandonner la recherche des anticorps hémagglutinants au profit des anticorps précipitants. Deux difficultés majeures s'opposent à l'utilisation de cette deuxième méthode : La nécessité d'un antigène très pur — première difficulté —, pour être sûr de la spécificité des anticorps mis en évidence. D'autre part — et ceci est la deuxième difficulté — les malades ayant reçu de multiples transfusions (comme c'est souvent le cas chez les cancéreux) présentent beaucoup de nombreux anticorps précipitants contre une variété d'antigènes (totalement étrangers à la tumeur) par exemple de type Australia et des lipoprotéines. C'est cependant une voie valable et à suivre. Ceci a été démontré encore récemment par différents chercheurs comme les HENLE utilisant comme antigène des extraits de cellules en culture de la lignée PJ3, ils ont trouvé des anticorps précipitants spécifiques chez des malades ayant une tumeur de Burkitt dans 59 % des cas. Ces résultats montrent bien que même si nous ne sommes pas en mesure de le démontrer dans notre système, l'organisme tente de se défendre contre des néoplasies.

Mais il faut toujours garder présent à l'esprit que l'impossibilité de démontrer un phénomène ne veut pas dire qu'il n'existe pas.

CONCLUSION.

Nous avons isolé à partir d'extraits de tumeurs coliques humaines un antigène qui est spécifique des cancers digestifs. L'antigène normalement présent dans l'intestin fœtal n'a pas été trouvé dans les mêmes tissus normaux adultes ni dans d'autres organes normaux ou cancéreux.

Cet antigène carcino-embryonnaire a été caractérisé par des méthodes physico-chimiques et ainsi il a été établi qu'il s'agit d'une glycoprotéine soluble dans l'acide perchlorique de faible poids moléculaire qui a tendance à se polymériser.

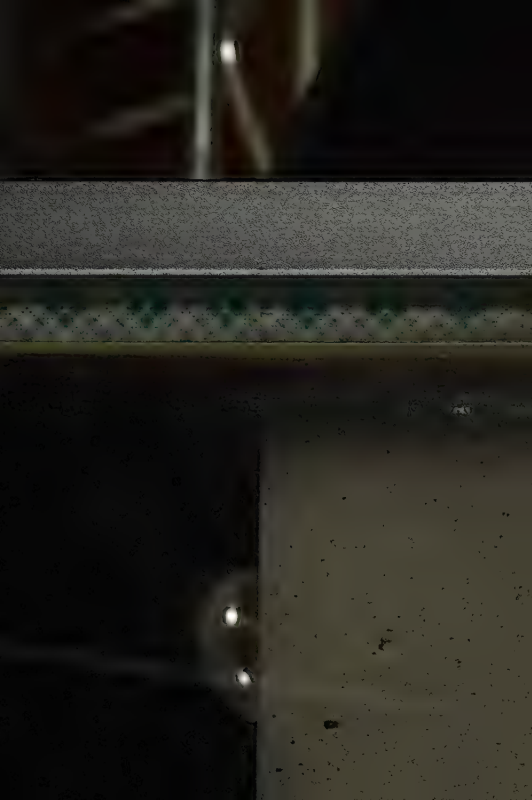
La localisation cellulaire de l'ACE a été déterminée par immunofluorescence. Il a été démontré que l'antigène se trouve sur la membrane de la cellule intestinale cancéreuse et fœtale. Les mécanismes éventuels commandant la réapparition de cette protéine sont discutés.

L'étude des anticorps circulants présents dans le sérum des malades n'a pas été concluante. Les anticorps décelés ne semblent pas être dirigés contre l'ACE, mais contre d'autres constituants tissulaires non encore identifiés.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BAUER, K. H. — Das Krebsproblem. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1963.
2. NOMENCLATURE ILLUSTRÉE. — U.I.C.C. — Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1965.
3. MASSON, P. — Tumeurs humaines — Histologie. Ed. Maloine, Paris, 1956.
4. KLEIN, G. — Antigenicity of tumors in genetically compatible animal hosts. Cellular Control Mechanisms and Cancer. Ed. by P. Emmelot and O. Mühlbrock, Elsevier, Amsterdam, 1964.
5. ABELEV, G. D. and SVETKOV, V. S. — The immunofiltration method for the elution of a specific antigen of a transplantable mouse hepatoma. *Probl. Oncol.* (N.Y.), 6 (1960), 856.
6. DECKERS, C. — Structure antigénique des tumeurs expérimentales. Thèse d'agrégation. Ed. Acia, Bruxelles, 1964.
7. STANISLAWSKI-BIRENCWAJG, M., URIEL, J. and GRABAR, P. — Association of embryonic antigens with experimentally induced lesions in the rat. *Cancer Res.*, 27 (1967), 1990-1997.
8. HELLSTRÖM, I. — A colony inhibition (Ci) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells *in vitro*. *Int. J. Cancer*, 2, (1967), 65.
9. BATCHELOR, K. J. — The use of enhancement in studying tumor antigens. *Cancer Res.*, 28 (1968), 1410.
10. ABELEV, G. — Study of the antigenic structure of tumors. *Acta Unio. Intern. Contra Cancer.*, 19 (1963), 80.
11. HIRSZFELD, L., HALBER, W. und LASKOWSKI, J. — Untersuchungen über die serologischen Eigenschaften der Gewebe. I — Über gruppenspezifische Differenzierung der Normal und Krebsgewebe. *Z. Immunitätsforsch.*, 64 (1929), 21.
12. WITEBSKY, E. — Disponibilität und Spezifität alcohollöslicher Strukturen von Organen und bösartigen Geschwülsten. *Z. Immunitätsforsch.*, 62 (1929), 59.
13. HIRSZFELD, L., HALBER, U. und ROSENBLATT, J. — Untersuchungen über Verwandtschaftsreaktionen zwischen Embryonal- und Krebsgewebe. II — Menschen-embryo und Menschenkrebs. *Z. Immunitätsforsch.*, 75 (1932), 209.

14. ABELEV, G. D., PEROVA, S. D., KRAMKOVA, N. J., POSTNIKOVA, Z. A. and IRLIN, I. S. — Production of embryonal serum α -globulin by the transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*, **1** (1963), 174.
15. TATARINOV, Yu. S. — Content of embryospecific α -globulin in the blood serum of human fetuses, newborn and adult man in primary cancer of the liver. (In Russian). *Vop. Med. Khim.*, **11** (1965), 20.
16. TATARINOV, Yu. S. and AFANASYEVA, A. V. — The detection of similar antigenic determinants in embryospecific α -globulin of man and certain animals. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **59** (1965), 65.
17. TATARINOV, Yu. S. — Fetal α -globulin in the sera of patients with primary liver tumors. I — *Biochem. Congress*, (U.S.S.R.) (Abstracts), **2**, (1964), 274.
18. ABELEV, G. D., ASSECRITOVA, S. V., KRALOVSKY, N. A., PEROVA, S. D. and PEROVODCHIKOVA, N. J. — Embryonal serum globulin in Cancer Patients : Diagnostic value. *Int. J. Cancer*, **2** (1967), 551.
19. HOUSTEK, J., MASOPUST, J., KITHIER, K. and RADL, J. — Hepatocellular carcinoma in association with a specific fetal α_1 -globulin, fetoprotein. *J. of Pediat.*, **72** (1968), 186.
20. MASOPUST, J., KITHIER, K., RADL, J., KOVTECKY, J. and KOTAL, L. — Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. *Int. J. Cancer*, **3** (1968), 364.
21. GOLD, Ph. and FREEDMAN, S. O. — Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.*, **121** (1965), 439.
22. GOLD, Ph. and FREEDMAN, S. O. — Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.*, **122** (1965), 467.
23. LANGVAD, E. — Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns in the tumor bearing colon. *Int. J. Cancer*, **3** (1968), 17.
24. RAPP, W., ARONSON, S. B., BURTIN, P. and GRABAR, P. — Constituents and antigens of normal human gastric mucosa as characterized by electrophoresis and immunoelectrophoresis in agar-gel. *J. Immunol.*, **92** (1964), 579.
25. KUNKEL, H. G. and WARD, S. M. — The immunological determination of human albumin in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, **182** (1950), 597.
26. FREUND, J. and McDERMOTT, K. — Sensibilisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **49** (1942), 548.
27. OUCHTERLONY, O. — Antibody-antigen reactions in gels. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **26** (1949), 507.
28. GRABAR, P. and WILLIAMS, C. A. — Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. *Biochim. Biophys. Acta*, **10** (1953), 193.
29. SCHEIDEGGER, J. J. — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **7** (1955), 103.
30. URIEL, J. — Les réactions de caractérisation des constituants protéiques. Dans : Grabar P. et Burtin P. : Analyse immuno-électrophorétique. Masson et Cie, Paris, 1960, pp. 33-69.
31. AVDEEV, G. — A study of antigens in some human tumors. *Series Cancerologica*, **2** (1966), 32.
32. ZILBER, L. et LUDOGOVSKAYA, L. — *Series Cancerologica*, **2** (1966), 32.
33. KLEIN, G. — Summary : Antigens of chemically induced tumors, and search for tumor specific antigens in other human cancer. (Kronman cité). *Cancer Res.*, **28** (1968), 1354.
34. TEE, D. E. H., WANG, M. and WATKINS, J. — Antigenic properties of human tumors. *Nature*, Lond., **204** (1964), 897.
35. TEE, D. E. H., WANG, M. and WATKINS, J. — Properties of human tumors. « Tumor specific » antigens. *Europ. J. Cancer*, **1** (1965), 315.
36. BJÖRKLUND, B. — Antigenicity of malignant and normal tissue by gel diffusion techniques. *Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.*, **8** (1956), 179.
37. BJÖRKLUND, B., LUNDBLAD, G. and BJÖRKLUND, V. — Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological techniques. II — Nature of tumor antigen. *Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.*, **12** (1958), 242.



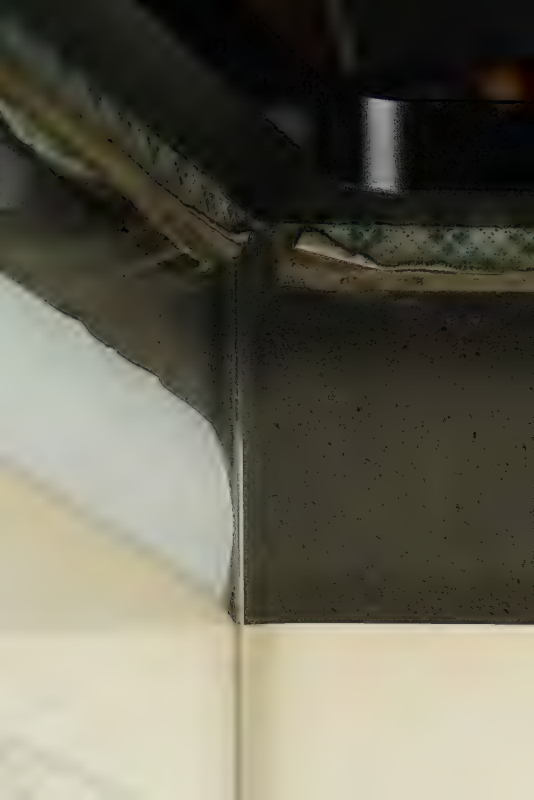


Table des abréviations utilisées dans le texte.

a	- anti.
ACE	- antigène carcinoembryonnaire.
CN	- colon normal.
e.d.	- eau distillée.
EN	- estomac normal.
ep.	- épuisé.
IE	- intestin embryonnaire.
IgG	- immunoglobuline G.
NT	- non tumoral.
PHN	- plasma humain normal.
PM	- poids moléculaire.
S _i P	- (extrait) semipurifié.
TC	- tumeur du colon.
TE	- tumeur de l'estomac.
v/v	- volume pour volume.

SOMMAIRE.

INTRODUCTION

a) Historique et nomenclature	15
b) Introduction	16

PREMIÈRE PARTIE.

Etude des antigènes de tumeurs coliques humaines	18
CHAPITRE I. — <i>Mise en évidence d'antigènes tumoraux</i>	18
— Introduction	18
— Matériel et Méthodes	18
— Résultats	25
— Discussion	28
CHAPITRE II. — <i>Isolement et caractérisation de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)</i>	32
— Introduction	32
— Matériel et Méthodes	32
— Résultats	34
— Discussion	38
CHAPITRE III. — <i>Localisation de l'ACE dans les cellules</i>	40
— Introduction	40
— Matériel et Méthodes	40
— Résultats	41
— Discussion	47

DEUXIÈME PARTIE.

Etude des anticorps dirigés contre les antigènes de tumeurs coliques	52
CHAPITRE IV. — <i>Etude des anticorps présents dans le sérum des malades atteints de cancers digestifs</i>	52
— Introduction	52
— Matériel et Méthodes	52
— Résultats	55
— Discussion	60
DISCUSSION	62
CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE	66
Table des abréviations utilisées	70

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Les néoantigènes d'origine virale

Vu et approuvé :

Paris, le 18 Juin 1970

*Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris*

Marc ZAMANSKY.

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Robert MALLET

Achevé d'imprimer le 3^e novembre 1971.

M. DECLUME, imprimeur, Lons-le-Saunier. — 495-71-150.
Novembre 1971 « Dépôt légal 4^e trimestre 1971 — N° 6229 ».

Printed in France.